

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Homéostasie phosphocalcique et vitamine D : effets sur le
cartilage de croissance par la mesure des paramètres
physiques, biochimiques et géniques liés à la croissance
osseuse**

par

Mélissa Desrosiers

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie

Août, 2007



© Mélissa Desrosiers, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Homéostasie phosphocalcique et vitamine D : effets sur le cartilage de croissance par la mesure des paramètres physiques, biochimiques et géniques liés à la croissance osseuse

présentée par :

Mélissa Desrosiers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Haddad, président-rapporteur
Dr Marielle Gascon-Barré, directrice de recherche
Dr Stéphane Roy, membre du jury

Résumé

Alors que le rachitisme, l'ostéomalacie et la carence en vitamine D sont considéré comme chose du passé dans les pays industrialisés, de nombreuses études publiées récemment rapportent des problèmes de déficience en vitamine D au sein des pays nordiques.

Nous avons étudié les répercussions du déséquilibre phosphocalcique sur la santé de l'os en croissance. Grâce à un model de rat carencé en vitamine D et en calcium et différentes diètes, nous avons fait varier l'apport en vitamine D, en calcium et en phosphore dans l'alimentation des animaux.

En comparant l'histologie du cartilage de croissance, l'expression de gène clé de la maturation chondrocytaires et de la vascularisation du cartilage de croissance et différent paramètres biochimiques (PTH, $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D, calcémie et phosphatémie) et physique (poids) nous avons tenté de déterminer si l'absence de vitamine D pouvait être compensé par l'apport en calcium et en phosphore.

De plus, nous avons montré qu'en absence de vitamine D, le ratio du calcium et du phosphore devenait très important. Finalement, l'expression génique de certaines protéines a été estimée pour évaluer si le cartilage de croissance de ces animaux, en fonction de l'état histologique de l'os, montrait le même profil d'expression selon le statut en vitamine D. Nos résultats montrent que l'expression génique n'est pas directement corrélée en fonction de l'histologie du cartilage de croissance.

Mots clés: Cartilage de croissance, carence, vitamine D, calcium, phosphore, rat, ratio, expression génique, chondrocytes, ossification endochondrale,

Abstract

Rickets, osteomalacia and vitamin D deficiency have been considered a disease of the past in developed countries but recent studies have shown that a vitamin D insufficiency and its associated health problems was still a prevalent in several northern countries.

The experiment consisted of demonstrating the consequences of an unbalanced phosphorus-calcium diet on the growing rate of bones. We tested our hypothesis in vitamin D and calcium deficient rats by feeding them diets that contained various amounts of vitamin D, calcium and phosphorus.

By comparing the growing cartilage histology, the chondrocyte maturation key gene expression, and several physical (weight) and biochemical (PTH, $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D, calcemia and phosphatemia) parameters, we tried to determine if, in a given diet, the intake of calcium and phosphorus could compensate for the absence of vitamin D.

Our study clearly showed that the calcium and phosphorus levels became even more relevant for vitamin D deficient rats than in vitamin D repleted rats.

We also evaluated the gene expression of a few proteins in order to determine if the growing cartilage of these animals, in relation with their histological states, showed the same expression profile depending on the vitamin D status. In conclusion, our results showed that the gene expression does not directly correlate with the growing cartilage histology.

Keywords: growth plate, vitamin D, calcium, phosphorus, deficiency, rat, ratio, gene expression, chondrocytes, endochondral ossification.

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1-LA VITAMINE D	1
1.1.1-MÉTABOLISME GÉNÉRAL	1
PRODUCTION ENDOGÈNE.....	1
APPORT EXOGÈNE	2
MÉTABOLISME	2
VITAMINE D 25-HYDROXYLASE.....	4
25(OH)-VITAMINE D 1-HYDROXYLASE.....	5
VITAMINE D 24-HYDROXYLASE.....	6
1.1.2-RÔLE DE LA VITAMINE D	7
MÉTABOLISME PHOSPHOCALCIQUE.....	7
INTESTIN	7
REIN.....	9
SQUELETTE	9
LE CAS SPÉCIFIQUE DES CHONDROCYTES	10
GLANDES PARATHYROIDES / PARATHORMONE	11
AUTRES ACTIONS DU SYSTÈME DE LA VITAMINE D	12
1.1.3-MÉDIATEUR DE L'ACTION DE LA VITAMINE D.....	13
LE RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE DE LA VITAMINE D	13
ACTION RAPIDE DE LA 1,25(OH) ₂ VITAMINE D	14
1.2-LES MINÉRAUX ESSENTIELS DE L'OS	15
1.2.1-LE CALCIUM	15
1.2.2-LE PHOSPHORE.....	16
1.2.3-LE RATIO CALCIUM :PHOSPHORE.....	17
1.3-L'Os.....	18
1.3.1- STRUCTURE DE L'OS	18
1.3.2- POPULATIONS CELLULAIRES	23
1.3.3- DÉSÉQUILIBRE DE L'OS EN CROISSANCE	24
OSTÉOMALACIE	25
RACHITISME.....	25
1.4-L'OSSIFICATION ENDOCHONDRAL.....	26
1.4.1-GÈNES IMPORTANTS DE LA MATURATION CHONDROCYTAIRE.....	30
SOX9.....	30
CTGF	32
1.4.2-LES GÈNES IMPORTANT DE L'ANGIOGÉNÈSE	34

VEGF	35
RÉCEPTEUR DU VEGF	37
VEGFR1	37
VEGFR2	38
MMP9	38
1.5-MODÈLE ANIMAL	40
1.5.1-LE RAT COMME MODÈLE ANIMAL D'OS LONG EN CROISSANCE	40
1.5.2-IMPACT DES RATIO CALCIUM :PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR LE MODÈLE ANIMAL DE RAT CARENCÉ EN VITAMINE D	40
1.6-HYPOTHÈSES ET BUTS.....	43
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
2.1-PRODUITS CHIMIQUES	45
2.2-MODÈLE ANIMAL DE RAT CARENCÉ EN CALCIUM ET EN VITAMINE D	45
2.3-DIÈTES ET TRAITEMENTS	46
2.4-PRÉLÈVEMENT DES PLAQUES DE CROISSANCE	50
2.5-EXTRACTION ET ANALYSE DES ARN DES PLAQUES DE CROISSANCE	50
2.6-SYNTÈSE D'ADNC ET PURIFICATION	51
2.7-RÉACTION D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE	51
2.8-ANALYSE DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES	52
2.8.1-ANALYSE DE LA 1,25(OH) ₂ VITAMINE D :	52
2.8.2-ANALYSE DE LA PARATHORMONE.....	53
2.8.3-ANALYSE DU PHOSPHORE	53
2.8.4-ANALYSE DU CALCIUM IONISÉ	53
2.9-ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS	53
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	57
3.1-POIDS	57
3.2-CALCÉMIE	57
3.3-PHOSPHATÉMIE.....	62
3.4-PARATHORMONE	65
3.5-1,25(OH) ₂ -VITAMINE D3	65
3.6-RELATION CALCIUM / Δ_{0-14} POIDS.....	70
3.7-RATIO CALCIUM : PHOSPHORE SÉRIQUE DANS LES GROUPES NE RECEVANT PAS DE VITAMINE D.	70
3.8-RELATION ENTRE LA CALCÉMIE ET LES CONCENTRATIONS SÉRIQUES DE PARATHORMONE.....	75
3.9-RELATION ENTRE LA PHOSPHATÉMIE ET LE NIVEAU SÉRIQUE DE PARATHORMONE.....	75
3.10-EXPRESSION GÉNIQUE DE CTGF.....	75
3.11-EXPRESSION GÉNIQUE DE SOX9	84
3.12-EXPRESSION GÉNIQUE DE VEGF	84
3.13-EXPRESSION GÉNIQUE DE VEGFR1 (FLT1)	84
3.14-EXPRESSION GÉNIQUE DE VEGFR2	89
3.15-EXPRESSION GÉNIQUE DE MMP-9	89

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	94
CHAPITRE 5: CONCLUSION.....	103
CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES	106

Liste des figures

Figure 1: Représentation des transformations enzymatiques menant à l'activation et à la dégradation de la vitamine D.	page 3
Figure 2: Représentation des actions classiques de la 1,25(OH) ₂ vitamine D.	page 8
Figure 3: Représentation des structures macroscopique d'un os long.	page 20
Figure 4: Représentation des structures microscopique de l'os.	page 22
Figure 5: Représentation du cartilage de croissance.	Page 29
Figure 6: Histologie de cartilage de croissance de rats en fonction de la diète.	Page 42
Figure 7: Schéma du model animal utilisé	page 49
Figure 8: Poids moyen des animaux selon le groupe.	Page 59
Figure 9: Calcémie moyenne selon le groupe.	Page 61
Figure 10: Phosphatémie moyenne selon le groupe.	Page 64
Figure 11: Concentration sérique de PTH moyenne selon le groupe.	page 67
Figure 12: Concentration sérique moyenne de 1-25(OH) ₂ vitamine D ₃ selon le groupe.	page 69
Figure 13 : Corrélation entre la calcémie sérique et le poids selon le groupe.	page 72

Figure 14:

Corrélation entre la calcémie et la phosphatémie selon le groupe.

page 74

Figure 15:

Corrélation entre la calcémie et la PTH sérique selon le groupe.

Page 77

Figure 16:

Corrélation entre la phosphatémie et la PTH sérique selon le groupe.

page 79

Figure 17:

Expression génique du CTGF selon le groupe.

page 81

Figure 18:

Expression génique de SOX-9 selon le groupe.

page 83

Figure 19:

Expression génique de VEGF selon le groupe.

page 86

Figure 20:

Expression génique de VEGFR1 selon le groupe.

page 88

Figure 21:

Expression génique de VEGFR-2 selon le groupe.

page 91

Figure 22:

Expression génique de MMP9 selon le groupe.

page 93

Liste des tableaux

Tableau I:

Quantité de calcium, phosphore et de vitamine D et ratio Ca:P dans la diète
des différents groupes expérimentaux

page 48

Tableau II:

Séquence des amorces et longueur des produits de PCR

page 55

Tableau III:

Programme PCR des différents gènes

page 56

Liste des abréviations

1,25(OH) ₂ D :	Calcitriol, 1,25 dihydroxy vitamine D
24,25 (OH) ₂ D:	24,25 dihydroxy vitamine D
25(OH)D :	25 hydroxy vitamine D
25(OH)D-1 hydroxylase:	25 hydroxy vitamine D-1 hydroxylase
ADN:	Acide désoxy-ribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ANOVA:	Analyse de variance
ARN:	Acide ribonucléique
Ca:	Calcium
CaSR:	<i>Calcium sensing receptor</i> (Récepteur détecteur de calcium)
Cl:	Chlore
CTGF:	<i>Connective tissue growth factor</i> (Facteur de croissance du tissu conjonctif)
CYP:	Cytochrome P450
D-25 hydroxylase :	Vitamine D-25 hydroxylase
DBP:	<i>Vitamin D binding protein</i> (Protéine de liaison à la vitamine D)
DCTP:	Désoxycytidine triphosphate
DEPC:	Diéthylpyrocarbonate
ELISA:	<i>Enzyme linked immunosorbent Assay</i> (Essai par immunosorbant lié à une enzyme)
FLT-1	VEGFR1
FLK	VEGFR2
IGF-BP:	<i>Insulin growth factor binding protein</i> (Protéine de liaison au facteur de croissance insulino-mimétique)
IRMA:	<i>Immunoradiometric assay</i> (Essai immunoradiométrique)
MAP-kinase:	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (Protéine kinase activée par des agents mitogènes)
MARRS:	<i>Membrane associated, rapid response steroid</i> (Stéroïde associé à la membrane déclenchant une réponse rapide)

MMP :	<i>Matrix metalloproteinase</i> (Métalloprotéinase de la matrice)
nmol	nanomole
P:	Phosphore
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> (Réaction de polymérisation en chaîne)
PKC:	Protéine kinase C
PLC:	Phospholipase C
PTH:	Parathormone
RANKL:	<i>Receptor activator of nuclear factor κB</i> (Ligand pour le récepteur pour l'activation du facteur nucléaire κ B)
RE:	Réticulum endoplasmique
RT :	<i>Reverse transcription</i> (Transcription inverse)
RXR:	<i>Retinoid X receptor</i> (Récepteur rétinol X)
TBE:	Tampon tris borate EDTA
TK:	Tyrosine-kinase
UV:	Ultra-violet
Vitamine D:	Vitamine D ₂ ou vitamine D ₃
VDR:	<i>Vitamin D receptor</i> (Récepteur à la vitamine D)
VDRE:	<i>Vitamin D response element</i> (Élément de réponse à la vitamine D)
VEGF:	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VEGFR1:	<i>VEGF receptor 1</i> (Récepteur de VEGF 1) Flt-1
VEGFR2:	<i>VEGF receptor 2</i> (Récepteur de VEGF 2) Flk-1

Remerciements

Merci à Dr Gascon-Barré qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Merci à Jean-Luc pour tout son aide et sa patience remarquable.

Merci mille fois à Christian. Pour les réponses à mes questions et pour tout le reste. J'espère que l'avenir te réserve des défis professionnels et cyclistes à ta hauteur.

Merci à tout les étudiants et employés du CRCHUM St-Luc. Vous avez rendu mon séjour agréable, je garde de précieux souvenirs de vous.

Pour l'agréable collaboration avec le labo LGSM, merci pour tout!

Une pensée particulière pour Anton et Karin et aux autres membres du labo Grandvaux qui ont égayé l'atmosphère.

Merci aux ami(e)s qui m'ont entouré, divertie amusé et aidé à continuer par leur présence! Pour votre amitié depuis tout ce temps, merci Marie-Ève, Éric et Berry.

Pascal pour la science et pour le reste, en pensant à ce qui s'en vient!

À ma famille qui a non seulement fait de moi ce que je suis, mais qui m'a permis de me rendre jusqu'ici par leur amour, leur aide et leurs encouragements, je vous serez toujours reconnaissante. Je vous aime.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1-LA VITAMINE D

1.1.1- MÉTABOLISME GÉNÉRAL

La première preuve de l'existence d'un composé actif dans l'absorption du calcium et la croissance des os fut trouvée dans l'huile de foie de morue ; c'est ce qui conféra à la vitamine D son titre de « vitamine » (1). Toutefois, elle peut être produite par le corps, transportée dans le sang et agir à distance ce qui fait aussi d'elle une hormone. C'est un sécostéroïde, un stéroïde dont le quatrième cycle est ouvert. C'est donc un composé lipophile qui doit voyager dans le sang lié à une protéine pour permettre sa solubilisation. De plus, son caractère lipophile permet son stockage dans le tissu adipeux. La vitamine D est un composé inerte qui, pour devenir actif, doit passer par deux hydroxylations ; la vitamine deviendra ultimement la 1,25dihydroxy vitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) (aussi appelé calcitriol), une hormone du système de la vitamine D et un composé plus hydrophile que la substance mère (2).

La vitamine D peut être de nature animale ou végétale. Cette différence est visible dans la structure de la molécule. Celle produite par l'homme ou par l'animal se nomme cholécalciférol ou vitamine D_3 . L'ergocalciférol ou vitamine D_2 , est produite par les végétaux, principalement le phytoplancton.

Production endogène

Il y a production endogène de vitamine D_3 lorsque des rayons UV de moins de 315 nm frappent une molécule de 7-déhydrocholestérol dans la membrane plasmique des kératinocytes. Cette molécule passera dans la circulation sanguine liée à la

« *vitamin D binding protein* », (DBP), la principale protéine liante de la vitamine D dans le sang (1; 3; 4). Une fois dans la circulation, la vitamine de fabrication endogène rejoindra celle provenant de l'alimentation.

De multiples facteurs font varier la production endogène de vitamine D₃; la latitude et les saisons entre autres. Environ 90% de l'apport en vitamine D provient de sa production endogène (5; 6). Plusieurs études récentes ont montré que de nombreuses populations humaines souffraient d'insuffisance ou d'une déficience en vitamine D (3; 5; 7-10).

Apport exogène

Les sources nutritionnelles en vitamine D sont limitées; seuls la chair et l'huile de certains poissons gras (saumon, sardine), les viscères de certains animaux (foie de morue) et le jaune d'œuf en contiennent. De plus, au Canada, le lait et la margarine sont obligatoirement enrichis en vitamine D (3; 5).

Les sources de vitamine D dans la nutrition peuvent être de nature animale (D₃) ou végétale (D₂). Cette différence est visible dans la structure de la molécule. Bien qu'elles aient historiquement été considérées comme équivalentes, des études tendent à montrer que la vitamine D₃ aurait une plus grande activité biologique chez les mammifères (11).

La vitamine D est absorbée dans l'intestin selon le même mécanisme que les autres composés lipidiques, habituellement à une hauteur de 60 à 90% (12-14). C'est la portion non-liée de la vitamine D qui arrivera au foie, et subira sa première hydroxylation, principalement dans les hépatocytes.

Métabolisme

La figure 1 illustre quelques-unes des transformations que subit la molécule de vitamine D. En plus des trois transformations principales, il faut se rappeler que des

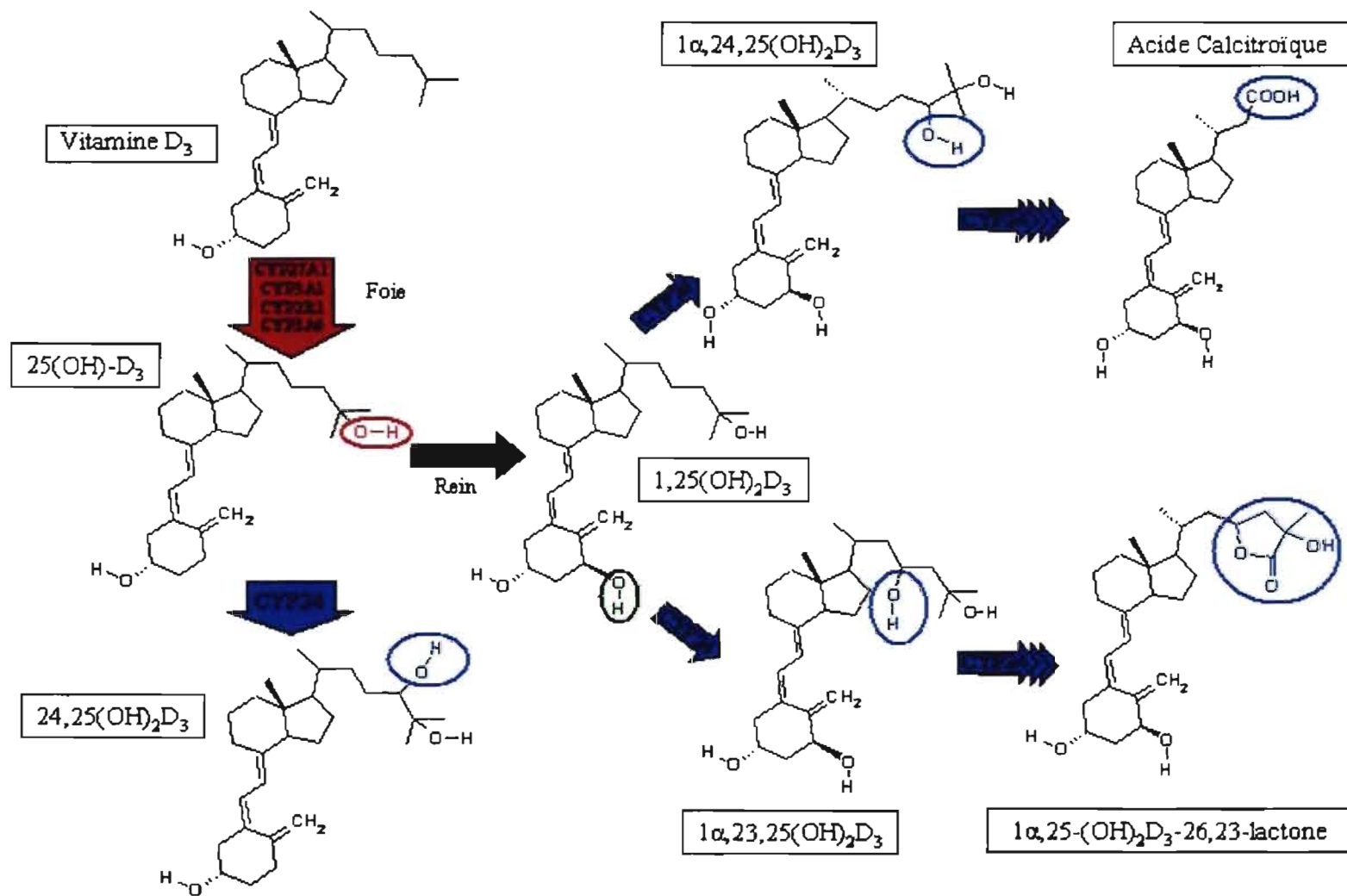


Figure 1: Représentation des transformations enzymatiques menant à l'activation et à la dégradation de la vitamine D.

dizaines de molécules intermédiaires sont produites et ne resteront dans la circulation que quelques minutes. Seules les voies principales de transformation de la molécule de la vitamine D sont illustrées.

VITAMINE D 25-HYDROXYLASE

La principale forme circulante de vitamine D est la 25hydroxy vitamine D (25(OH)D). La vitesse à laquelle la vitamine D est hydroxylée une première fois, dans le foie, se fait presque entièrement en fonction de la concentration du précurseur dans le sang (13). C'est ce qui explique que la 25(OH)D est un représentant fiable du statut en vitamine D, et qu'elle est habituellement le métabolite mesuré pour connaître ce statut. La 25(OH)D voyage elle aussi dans le sang lié à la DBP (12).

De nombreuses enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP27A1, CYP2D11, CYP2D25, CYP2J2/3, CYP3A4) possèdent une activité D-25-hydroxylase. Cependant, jusqu'à tout récemment, aucune de celles-ci ne possédait l'affinité ou l'activité correspondant aux observations faites *in vivo* (15; 16). En 2003, l'équipe de Russel a montré qu'une enzyme orpheline de la famille des cytochromes P450, le CYP2R1 montrait une activité D-25-hydroxylase dont les caractéristiques enzymatique *in vitro* étaient compatibles avec les paramètres biologiques (17). Ce même groupe a présenté le cas d'un sujet porteur d'une substitution dans ce gène qui présentait des symptômes de rachitisme (18). Le CYP2R1 est conservé à travers l'évolution et est présent chez l'humain, le rat, la souris et le porc entre autres (15; 18). Il n'est, cependant, pas exclus que plusieurs autres CYPs contribuent *in vivo* à la 25-hydroxylation de la vitamine D.

Lorsque la 25(OH)D entre dans la circulation sanguine, deux voies principales s'offrent alors à elle; la transformation en métabolite actif par son hydroxylation sur le

premier carbone avec la production de l'hormone 1,25dihydroxy vitamine D ou des transformations sur d'autres sites de la molécules qui mènent à sa dégradation.

25HYDROXY-VITAMINE D 1-HYDROXYLASE

L'hydroxylation du premier carbone de la molécule est l'étape limitante de la formation du composé actif, la 1,25dihydroxy vitamine D. L'enzyme responsable de cette hydroxylation fut clonée en 1997 (19) et nommée CYP27B1. C'est une enzyme de la membrane interne mitochondriale, et des mutations dans la séquence de l'enzyme produisent un phénotype de rachitisme. La 1,25(OH)₂D produite dans le rein est exportée vers la circulation sanguine et agira à travers l'organisme sur les tissus cibles de l'hormone (20). De nombreux autres types cellulaires (entérocytes, kératinocytes, ostéoblastes, macrophages, cellules de la prostate, cellules non parenchymateuses hépatiques, entre autres) produisent aussi de la 1,25(OH)₂D (2; 6; 21). Contrairement à celle produite dans le tubule contourné proximal, toutefois, la 1,25(OH)₂D extra-rénale semble avoir une action paracrine ou autocrine. La 1,25(OH)₂D qui agit de façon endocrine induit les actions dites classiques associées à la vitamine D (régulation du métabolisme phosphocalcique) alors que ses actions auto ou paracrine induisent les rôles nommés non classiques (action anticancéreuse, sur le système immunitaire etc.) (voir la section 1.2).

L'expression du CYP27B1 varie grandement selon les conditions et selon le type de cellules. La 1,25(OH)₂ D fait diminuer l'expression du CYP27B1 alors que la PTH la fait augmenter (16; 21; 22). Le calcium sérique semble réguler le CYP27B1 indirectement via la PTH et directement par le *Calcium sensing receptor* (CaSR) (23). La calcitonine semble agir en faisant augmenter l'expression de l'enzyme (24) et finalement le phosphore la régule par le biais du FGF-23 (25). Le CYP27B1 qui

produit la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ locale serait régulé par des facteurs de communication intra ou intercellulaires tels les cytokines et les facteurs de croissances (21; 22).

VITAMINE D 24-HYDROXYLASE

Le CYP24A1 est une enzyme qui catabolise plusieurs réactions, mais qui est traditionnellement connue pour l'hydroxylation en position 24 de la $25(\text{OH})\text{D}$ ou de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. C'est dans le rein que son expression est la plus élevée mais la plupart des cellules cibles du système de la vitamine D l'expriment (2; 15; 16).

Le CYP24A1 est la voie principale de dégradation des métabolites de la vitamine D. Il permet de réguler étroitement les concentrations de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, étant donné sa grande activité biologique. Il métabolise la $25(\text{OH})\text{D}$ en $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, mais la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ semble être le substrat préférentiel de l'enzyme avec la production d'un métabolite inactif, la $1,24,25(\text{OH})_3$ vitamine D (2; 15; 26; 27).

Compte tenu de son rôle dans le métabolisme de la vitamine D, la D-24 hydroxylase elle-même est étroitement régulée. Deux éléments de réponse à la vitamine D (VDRE *vitamin D response element*) sont présents dans sa région promotrice (16). Sa régulation est à l'opposé de celle du CYP27B1; elle est induite par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, alors que la PTH agit à l'inverse (28). Le niveau d'expression du CYP24 est très faible dans les conditions normales mais peut être augmenté considérablement lorsqu'une grande quantité de $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D entre dans la circulation. Il semble que tout comme le CYP27B1, la régulation du CYP24A1 se fait à deux niveaux : le taux circulant est contrôlé par les cellules du tubule contourné proximal, alors que le niveau local de calcitriol serait régulé par l'ensemble des cellules du système de la vitamine D qui possèdent le CYP24 (29).

1.1.2-RÔLE DE LA VITAMINE D

Classiquement, la vitamine D est reconnue pour agir sur le métabolisme phosphocalcique et a ainsi une influence sur la santé osseuse. Elle influence principalement l'os, le rein, l'intestin, et la glande parathyroïde.

Comme vu précédemment, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit aussi sur son propre métabolisme. Finalement, les rôles dans la prolifération, la différenciation et sur le système immunitaire sont associés aux actions non classiques de la vitamine D.

Métabolisme phosphocalcique

Un résumé des actions de la vitamine D sur le métabolisme phosphocalcique est illustré à la figure 2.

INTESTIN

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit de façon générale en contribuant à l'augmentation des concentrations sériques de calcium. Le premier organe affecté par l'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sérique est le petit intestin. En effet, la capacité d'absorption intestinale du calcium et du phosphore va augmenter rapidement sous l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (21). Le passage du calcium dans les canaux membranaires est facilité par le calcitriol; il augmente l'expression de protéine qui permettent l'entrée du calcium dans les entérocytes, et sa sortie sur la face apicale. L'expression de la calbindine 9K, une protéine qui lie le calcium cellulaire afin d'éviter de modifier l'équilibre ionique intracellulaire est également augmentée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (30). L'absorption du phosphore est étroitement reliée à celle du calcium et les deux seront modifiées par la présence de l'hormone de la vitamine D. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ augmente l'absorption du phosphore en produisant un accroissement du transport trans-cellulaire par la synthèse d'une pompe Na/Pi, la NPT2b (31).

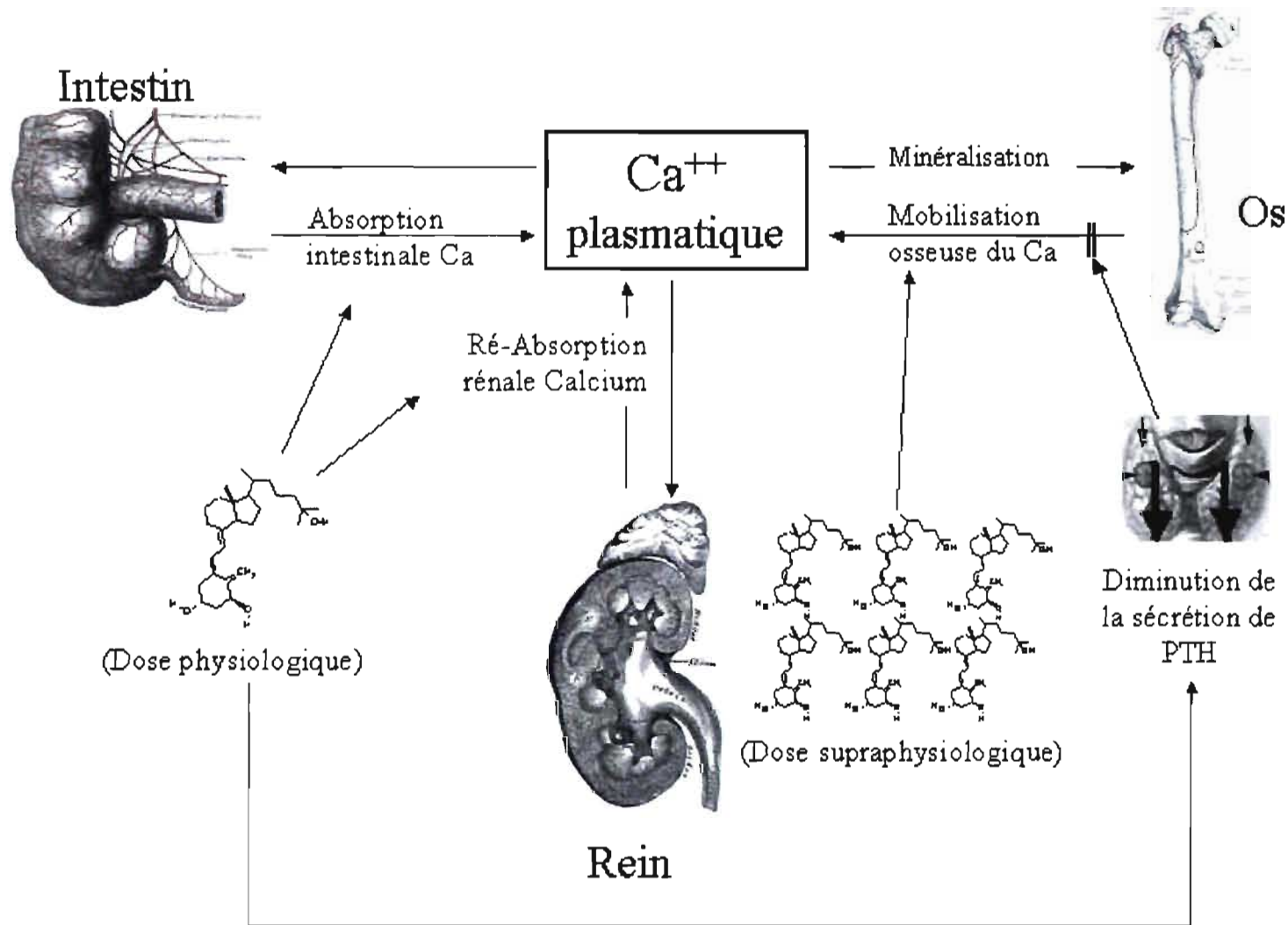


Figure 2: Représentation des actions classiques de la 1,25(OH)₂vitamine D. Les images de rein, d'os et d'intestin proviennent du du Gray Anatomy édition 1918 et (B) du siite SEER's Training Web Site, (http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html) par le US National Cancer Institute.

REIN

De nombreux facteurs agissent sur le rein. En effet, il est un organe important dans l'homéostasie ionique de l'organisme.

L'un des effets de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur le rein est de moduler l'expression des enzymes qui régulent sa production et sa dégradation. Elle fait augmenter dans le rein l'expression du CYP24 et fait diminuer celle du CYP27B1, ce qui permet ainsi de maintenir les concentrations de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ à l'intérieur d'une marge étroite (21).

Outre sa propre régulation, la vitamine D agit aussi sur le rein pour augmenter la réabsorption du calcium et du phosphore. La partie proximale du néphron n'est pas sous contrôle endocrinien et la réabsorption du calcium à lieu de façon constante. C'est la régulation de la réabsorption du calcium de la dernière portion du néphron, dans le tubule distal qui est modulé par l'hormone (32). Cette réabsorption se fait contre un gradient de concentration et elle nécessite la présence de la PTH et de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (32; 33).

SQUELETTE

Les effets de la vitamine D sur le squelette sont nombreux et se produisent à plusieurs niveaux. De façon indirecte, en agissant sur le métabolisme phosphocalcique et directement par l'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur les différents types cellulaires qui peuplent l'os. Cependant l'action classique de la vitamine D sur l'os relève surtout de son effet indirect.

L'action indirecte de la vitamine D est due à son effet sur les concentrations sériques de calcium et de phosphore. L'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur le rein et l'intestin va permettre de conserver ces concentrations à un niveau suffisant pour permettre la minéralisation (21). Le déséquilibre phosphocalcique induit par la carence en vitamine D mène ultimement au rachitisme chez l'enfant et à l'ostéomalacie chez l'adulte.

Mais le calcitriol agit aussi directement sur les cellules qui peuplent l'os. En effet, les animaux dont l'enzyme 25(OH)D-1 hydroxylase est inactivée et qui sont nourris avec un régime qui normalise les concentrations sériques de calcium et de phosphore montrent un rétablissement de la majorité des symptômes dûs à la déficience en 1,25(OH)₂D mais il subsiste un effet sur l'os (34). Les rapports sur les effets du calcitriol sur les cellules osseuses concernent la différenciation et la prolifération des cellules osseuses, des effets plutôt associés au rôle non classique de la vitamine D (21; 35-37).

Les effets de la vitamine D dans l'os sont dépendants de sa concentration. Sur les ostéoblastes, une dose physiologique de 1,25(OH)₂D semble avoir un effet anabolique (38). L'invalidation du VDR diminue la masse osseuse chez la souris (39). L'effet sur les ostéoclastes est indirect puisqu'il semble secondaire des effets de l'hormone sur les ostéoblastes (40). À dose pharmacologique, le calcitriol stimule la formation des ostéoclastes et induit la résorption osseuse. Cet effet nécessite l'action de la PTH (41). En condition physiologique, toutefois, le calcitriol inhibe l'effet de la PTH sur la résorption osseuse et ainsi favorise l'augmentation de la masse osseuse (41; 42). *In vivo*, la 1,25(OH)₂D agit de concert avec la PTH.

LE CAS SPÉCIFIQUE DES CHONDROCYTES

Les chondrocytes sont pourvus du récepteur membranaire à la vitamine D et de plus en plus de faits tendent à prouver qu'ils expriment un récepteur membranaire (43). Ils expriment aussi les enzymes CYP27B1 et CYP24 (44). Des données de plus en plus nombreuses montrent que deux métabolites de la vitamine D agissent sur les chondrocytes ; la 1,25(OH)₂D et la 24-25(OH)₂D. Ces deux métabolites semblent cependant être produits localement et seraient régulés à ce niveau (6). De plus, ces deux métabolites semblent agir à des stades différents de la maturation des

chondrocytes. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit sur les chondrocytes au stade terminal de la maturation, et a un effet sur la vascularisation (45) alors que la $24\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}$ agit sur les chondrocytes au début de la prolifération en augmentant la prolifération et la synthèse protéique (46). L'article de Wu *et al.* (47) montre de façon convaincante l'effet de ces deux métabolites sur la minéralisation des chondrocytes *in vitro*. Le calcitriol seul semble avoir un effet inhibiteur sur la minéralisation alors que la $24\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}$ au contraire faciliterait le processus de minéralisation. Ces effets seraient induits par les prostaglandines (48).

GLANDES PARATHYROÏDES / PARATHORMONE

Les glandes parathyroïdes sécrètent la parathormone (PTH), une hormone importante du métabolisme phosphocalcique. Les cellules des glandes parathyroïdes sont pourvues d'un CaSR qui leur permet de détecter le niveau de calcium sérique. Lorsqu'il baisse, la PTH emmagasinée dans les granules cellulaires de la glande parathyroïde est relâchée et va lier des récepteurs membranaires à la PTH dans l'os et le rein. Plusieurs événements vont alors engendrer une augmentation de la concentration sérique de calcium et une diminution de celle du phosphore. La PTH participe à une boucle de régulation du métabolisme de la vitamine D; elle agit sur la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit en retour sur la production de PTH. Une boucle semblable existe aussi entre les concentrations circulantes de calcium et le niveau de sécrétion de la PTH (49).

Bien que le calcium soit le premier régulateur de la concentration de PTH, la présence de vitamine D en quantité suffisante dans le sang permet aussi de diminuer la synthèse du gène de la parathormone (50). Inversement, la PTH agit dans le rein en stimulant la transcription du CYP27B1 (16) et en inhibant celle du CYP24 (49). La

PTH agit également en augmentant la réabsorption rénale du calcium et en bloquant celle du phosphore (49; 51).

Des études récentes montrent que selon la forme circulante de la PTH (formes 1-84, 1-34 ou fragments carboxy-terminaux), les effets seraient induits par différents récepteurs qui produiraient des effets différents et opposés (52).

Dans l'os la PTH a un effet différent selon qu'elle agit de façon chronique ou aiguë. Lors d'une hypocalcémie chronique, la PTH sera continuellement sécrétée ; elle favorise alors la résorption osseuse. Si la stimulation par la PTH est intermittente, elle aura plutôt un effet anabolisant et favorisera la différenciation et la prolifération des ostéoblastes. La PTH agit sur l'ostéoblaste en induisant l'expression de plusieurs gènes (53).

Autres actions du système de la vitamine D

De nombreux autres rôles que l'équilibre phosphocalcique ont été montrés dans les dernières années et les mécanismes moléculaires de ces actions commencent à être élucidés.

Le rôle protecteur de la vitamine D dans la prévention du cancer est de plus en plus reconnu. L'effet anticancéreux serait dû à la suppression de la croissance cellulaire pour laisser la cellule dans la phase de quiescence et promouvoir la différenciation. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produite localement serait plus efficace pour produire ces effets parce qu'elle atteindrait localement des concentrations cellulaires plus élevées que celle du calcitriol apporté par la circulation.

La régulation de l'apoptose est un autre moyen par lequel la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ diminue la prolifération. Il semble que l'induction de l'apoptose par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ soit exclusive aux cellules néoplasiques alors que chez les cellules saines, l'effet est opposé (21).

La réponse immunitaire est également modulée par la vitamine D. La tolérance aux transplantations, les maladies auto-immunes et les infections sont trois champs dans lesquels des études ont démontré un effet significatif. La fonction musculaire, la sécrétion d'insuline et le système rénine angiotensine sont d'autres domaines dans lesquels des études commencent à montrer les effets importants de la vitamine D (21).

1.1.3-MÉDIATEUR DE L'ACTION DE LA VITAMINE D

Le calcitriol agit principalement sur les cellules en augmentant ou en diminuant la transcription de gènes. L'effet sur l'ADN est induit par le VDR, le récepteur nucléaire à la vitamine D et prend plusieurs heures à se manifester. Certaines actions du calcitriol sont cependant trop rapides pour agir via la transcription. Cette observation laisse à penser qu'un autre récepteur de type membranaire existe.

Le récepteur nucléaire de la vitamine D

Le récepteur nucléaire à la vitamine D (VDR) fut découvert dès 1969 (13). Au cours des ans, plusieurs effets médiés par ce récepteur furent mis en lumière ; l'expression du CYP24, de la calbindine 9K, du CYP27B1 et de la PTH sont parmi ses cibles principales. Le calcitriol peut agir sur la transcription tant à la hausse (CYP24 et calbindine 9K) qu'à la baisse (PTH et CYP27B1) (49).

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ lie le VDR avec une forte affinité (10^{-10} M). Le changement de conformation qui est induit par le ligand sur le récepteur entraîne un déplacement rapide au noyau le long des microtubules (21). Pour lier l'ADN et agir sur la transcription, le VDR doit alors se dimériser avec le RXR, le *retinoid X receptor*. Le dimère se lie alors à l'ADN sur des éléments de réponse à la vitamine D qui sont situés dans la région promotrice du gène régulé. Le complexe calcitriol-VDR-RXR recrute

alors des groupes de cofacteurs (54). En se liant au VDR-RXR, les groupes de cofacteurs interagissent avec d'autres protéines de la machinerie cellulaire. Ces groupes de cofacteurs peuvent agir de différentes façons; le groupe SRC/p160 a une activité histone acétylase, ce qui augmente l'accessibilité à l'ADN (27; 55). Un autre groupe de co-facteurs, nommé DRIP, agit en recrutant la machinerie nécessaire à l'activité de l'ARN polymérase II (49; 56). Ces deux groupes de co-facteurs augmentent la transcription des gènes cibles. Des groupes de co-facteurs découverts récemment (SMRT et NcoR) ont une activité de co-répresseur mais on ne connaît pas encore les mécanismes d'action qui régissent cette répression (21; 57).

Action rapide de la 1,25(OH)₂ vitamine D

Certains effets induits par le calcitriol sont trop rapides pour impliquer l'expression génique. La sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, l'ouverture de canaux Ca et Cl⁻ dans les ostéoblastes et l'absorption rapide du calcium dans l'intestin sont les fruits d'un mécanisme autre que la modulation de l'expression génique (58).

En 1994, l'équipe de Norman (59) publiait la découverte d'un récepteur nommé 1,25(OH)₂D-MARRS, pour *membrane associated rapid response steroid*. Cependant, il fut démontré par la suite, que la présence du récepteur nucléaire était nécessaire pour que le calcitriol agisse rapidement (60).

Une des hypothèses présentement en vigueur indique que le VDR soit le seul récepteur ayant une activité physiologique. Par contre, l'action du calcitriol passerait par un mécanisme génomique ou non-génomique selon la conformation cis ou trans de la molécule (58). D'autres auteurs ont avancé l'hypothèse que l'action d'un récepteur membranaire serait régulée par le VDR parce qu'il en régulerait la transcription ou

encore par l'action du VDR lui-même selon qu'il serait placé à la membrane (effets rapides) ou dans le cytoplasme (effets lents) (43).

1.2-LES MINÉRAUX ESSENTIELS DE L'OS

De nombreux minéraux existent dans l'os. Le calcium et le phosphore forment la plus grande proportion de la masse osseuse et sont essentiels à la constitution osseuse. Le fluor, le potassium, le fer et le magnésium sont aussi des minéraux importants dans la santé osseuse mais sont présents en plus petite quantité. Finalement, des micronutriments sont aussi nécessaires en faible quantité : le cuivre, le zinc, le manganèse et le bore sont présents dans l'os. Ces micronutriments sont souvent nécessaires comme co-facteurs pour les enzymes de la synthèse ou les modifications post-translationnelles des protéines de la matrice osseuse (61).

1.2,1-LE CALCIUM

Le calcium est un minéral important de la physiologie animale. Il joue principalement deux rôles. En effet, dans l'os, les sels de calcium procurent la dureté nécessaire à la structure osseuse. Dans les fluides intra- et extra-cellulaire, le calcium régule de nombreux processus biochimiques; il joue, entre autre, le rôle de second messager. Pour ces deux fonctions, les concentrations de calcium sont étroitement contrôlées. La concentration dans le fluide extracellulaire est de l'ordre de 10^{-3} M, alors que dans le cytoplasme elle est plutôt de 10^{-6} M (62).

Plusieurs mécanismes de contrôle de la concentration de calcium extracellulaire existent; la PTH, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la calcitonine sont les trois hormones principales qui régulent les concentrations de calcium extracellulaire. Deux de celles-ci (la PTH et le calcitriol) agissent en augmentant la concentration alors que la calcitonine la diminue. Lorsque les concentrations de calcium sérique varient, l'os

permet de tamponner ces variations en agissant comme un réservoir à partir duquel on peut re-larguer ou emmagasiner le calcium (14).

Les cellules qui répondent aux variations de calcium peuvent les détecter par l'intermédiaire du CaSR. C'est un récepteur à sept passages trans-membranaires lié à une protéine G. La fixation du calcium sur le récepteur stimule la phospholipase C qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire. Selon la cellule, cette augmentation va engendrer diverses réponses (63). Dans l'os, bien que la présence du CaSR a été détectée sur les ostéoblastes et les ostéoclastes, son rôle demeure controversé (64).

Le calcium dont un organisme à besoin est apporté par sa diète. On le retrouve dans de nombreux aliments (les produits laitiers, certains légumes et légumineuses, certains poissons et les noix). Néanmoins, une bonne proportion de la population a un apport en calcium plus bas que l'apport quotidien recommandé (65).

D'autres facteurs influencent le statut calcique. En effet, son absorption est difficile à travers les membranes lipidiques à cause de sa double charge. De plus, une certaine quantité de calcium est perdue dans l'urine et dans la bile chaque jour. Si une quantité équivalente aux pertes de calcium n'est pas ingérée, la balance sera alors négative (62).

1.2.2-LE PHOSPHORE

Quantitativement, le phosphore est le deuxième ion après le calcium dans l'os où il se trouve sous forme de sel. La proportion de phosphore qui n'est pas dans l'os est retrouvée sous forme de phosphate, PO_4^{3-} principalement dans les membranes protéiques, acides nucléiques ou liée aux protéines. Finalement, une très faible proportion est aussi retrouvée dans le sang sous forme de phosphate inorganique. Cette fraction est cruciale puisque c'est dans ce compartiment que le phosphate qui est

absorbé se retrouve, et que celui nécessaire aux fonctions biologiques sera prélevé. C'est donc ce compartiment qui reflète le statut phosphorique (66).

Le phosphore joue plusieurs rôles importants dans le corps; il aide au maintien de l'équilibre acido-basique, en formant des tampons phosphatés. Il participe à la formation de réserves d'énergie sous la forme d'adénosine-tri-phosphate. Finalement, la phosphorylation de nombreuses protéines permet leur activation ou leur désactivation. Puisque ces processus laissent la molécule de phosphate intacte, ils permettent son recyclage. Seul la croissance tissulaire et le remplacement des quantités excrétées nécessitent un apport en phosphore. Chez les vertébrés, la croissance osseuse est un des éléments cruciaux de la quantité de phosphore requise par l'organisme (62).

Cependant, puisque le phosphate est retrouvé dans tous les organismes vivants comme un constituant de la membrane cellulaire, les sources de phosphore ne manquent pas dans l'alimentation. De plus, les nourritures préparées industriellement contiennent souvent du phosphate pour leur conservation; c'est donc dire que la quantité de phosphore dans l'alimentation occidentale a augmenté considérablement dans les dernières décennies. Les cas de déficience en phosphore sont rares et sont souvent les signes de problèmes métaboliques plutôt que d'une carence alimentaire (67).

1.2.3-LE RATIO CALCIUM : PHOSPHORE

Tant chez les animaux que chez l'humain, il existe depuis longtemps un lien entre la quantité de calcium et de phosphore absorbé (68). En fait, l'hypothèse la plus communément répandue veut que le calcium et le phosphore forment dans l'intestin des sels insolubles, ce qui entraîne la diminution de l'absorption des deux composants. Puisque le phosphore est habituellement présent en plus grande quantité dans

l'alimentation et qu'il est absorbé plus facilement, c'est surtout les niveaux de calcium qui en souffrent. Cette hypocalcémie entraîne une hyperparathyroïdie secondaire qui va elle-même produire à long terme une diminution de la densité osseuse.

C'est donc dire que le ratio calcium :phosphore (Ca :P) dans la diète a un effet primordial sur leur absorption. Le ratio idéal doit prendre en compte l'efficacité de l'absorption de chacun des minéraux. Il est établi à environ 2.2 :1 pour les organismes en croissance (puisque la facilité d'absorption du calcium varie avec l'âge) (66). Ce ratio n'est pas déterminant de tout ; un ratio correct mais une quantité nettement trop faible ne permet pas de normaliser les concentrations sériques des minéraux.

1.3-L'OS

L'os est un système important qui remplit plusieurs fonctions : il donne sa charpente au corps, protège certains organes importants, permet le mouvement, l'hématopoïèse, la croissance et participe activement à l'homéostasie de certains minéraux (69). C'est un tissu conjonctif qui s'est spécialisé, il est rigidifié par une matrice extracellulaire inorganique, principalement constitué de divers sels de calcium. Le squelette est formé de trois populations cellulaires embryonnaires: la crête neurale formera la région cranio-faciale, les cellules du mésoderme latéral formeront les membres et finalement les cellules provenant du sclérotome formeront le tronc (côtes, colonne vertébrale, sternum et pelvis) (70).

1.3.1- STRUCTURE DE L'OS

Macroscopiquement, on peut diviser les os en quatre catégories ; les os longs, courts, plats et irréguliers. Les os longs se trouvent dans les membres et on y distingue trois régions: l'épiphyse, la diaphyse et la métaphyse. La position de ces trois structures est illustrée sur la figure 3. Dans l'os sain et mature, il existe 2 types de tissus osseux :

compact et spongieux. Pour les os courts, plats et irréguliers une mince enveloppe d'os compact recouvre le centre fait d'os spongieux. Les os longs sont recouverts d'os compact ; au niveau de la diaphyse, l'os compact forme une couche épaisse. L'épaisseur de l'os compact diminue au niveau de la métaphyse et reste mince sur l'épiphyse. Aux extrémités de l'os, il est recouvert par le cartilage articulaire. L'intérieur des os longs est rempli d'os spongieux sauf pour un canal au centre de la diaphyse, appelé cavité médullaire. C'est dans la partie spongieuse des os plats et dans la diaphyse des os longs que se trouve la moelle osseuse, lieu de l'hématopoïèse. La surface externe de tous les os (à l'exception de celle recouverte de cartilage articulaire) est recouverte d'un tissu conjonctif appelé périoste (71; 72). Le tissu osseux, qu'il soit compact ou spongieux est constitué de cellules qui sont enchâssées dans une matrice extracellulaire organique qui est calcifiée par des sels inorganiques. La matrice osseuse est principalement constituée de collagène type I. On retrouve aussi dans la matrice une grande variété de protéines présentes en petite quantité (ostéonectine, ostéopontine, ostéocalcine et protéoglycans entre autres). Les rôles de ces molécules sont très divers et ne sont pas encore complètement établis mais touchent la minéralisation, la résorption, la déposition de la phase inorganique, la liaison entre la phase organique ou cellulaire et inorganique. Finalement on retrouve aussi dans la matrice plusieurs facteurs de croissance (TGF- β , IGF, PDGF, CSF, *etc.*) et des cytokines (IL-1 et IL-6 principalement) qui sont relâché dans le milieu lors de la résorption de l'os (73; 74). La fonction de certaines de ces molécules sera revue de façon plus complète à la section 1.4.

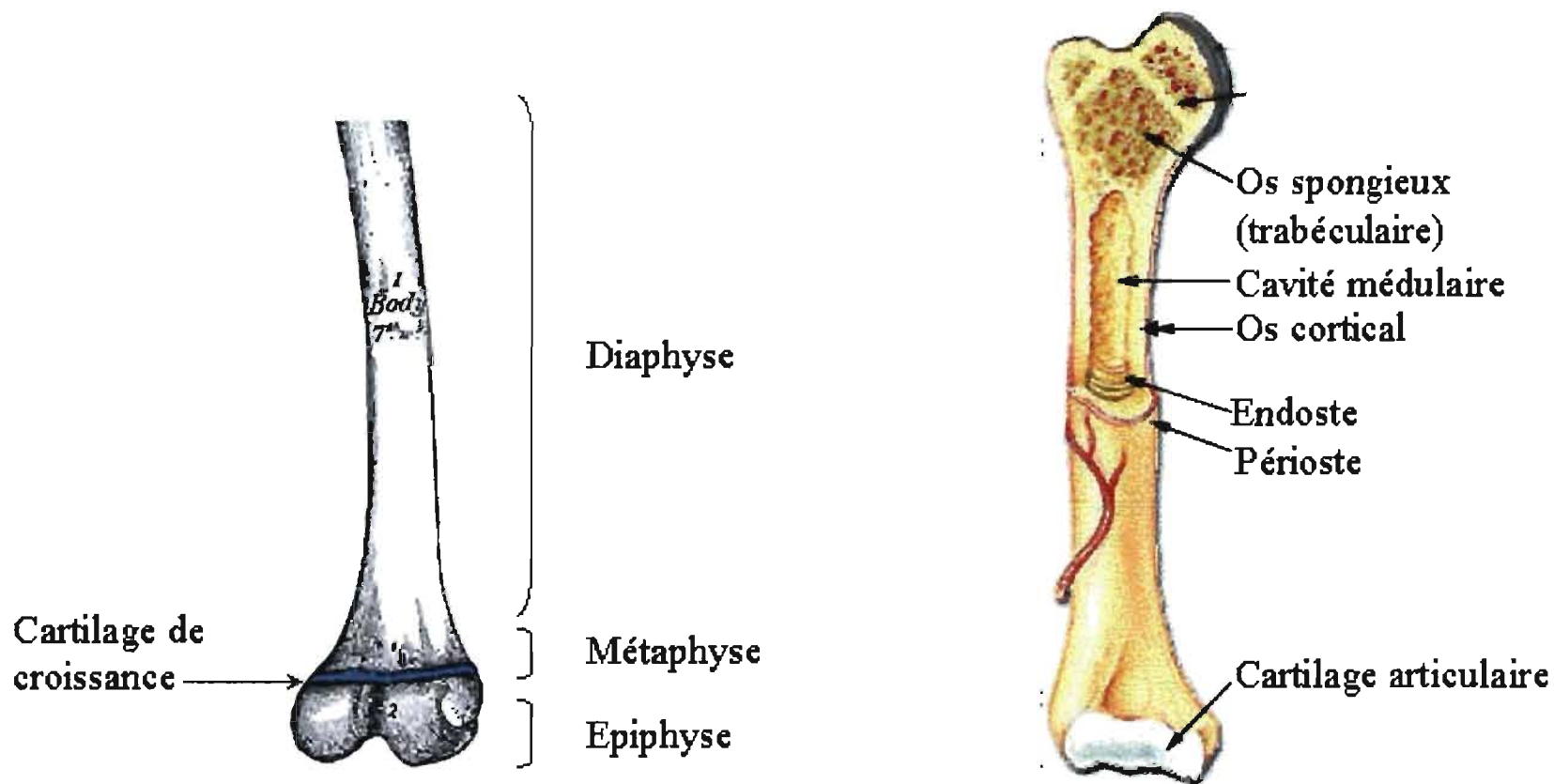


Figure 3: Représentation des structures macroscopique d'un os long. . Image provenant (A) du Gray Anatomy édition 1918 et (B) du siite SEER's Training Web Site, (http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html) par le US National Cancer Institute.

Le minéral qui calcifie l'os est semblable à l'hydroxyapatite de calcium dont la formule est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. *In vivo* cependant le cristal n'est pas pur et présente de multiples modifications ; l'ion calcium est remplacé par divers ions, tel le sodium ou le magnésium ou est parfois simplement absent. Ce cristal donne à l'os sa rigidité et permet à l'organisme d'entreposer le calcium et le phosphore qui pourront être relargués en cas de besoin (75; 76).

Les parts organiques et inorganiques de la matrice extracellulaire sont assemblées en une structure organisée. Le premier niveau d'organisation de cette structure est la lamelle. Une lamelle est un faisceau de fibre de collagène parallèle et enroulé en spirale. Elles résultent de la façon rythmique selon laquelle les fibres sont sécrétées par les ostéoblastes. Le second degré d'organisation est l'arrangement des lamelles qui détermine le type d'os formé. Dans l'os spongieux, la lamelle est sous forme de plaque et de « tige », qui s'arrangent selon les lignes de forces mécaniques auxquelles l'os est soumis. Dans l'os compact, les lamelles sont organisées de façon concentrique autour d'un canal central (longitudinal à la structure de l'os) appelé « canal de Havers » dans lequel passent un ou des capillaires et parfois un nerf et un canal lymphatique. L'ensemble formé des lamelles et du canal s'appelle ostéon. Les canaux de Havers des différents ostéons sont reliés entre eux par des canaux « de Volkmann » (71; 72). Les éléments de la structure macroscopique et microscopique de l'os sont illustrés sur la figure 4.

Finalement, *l'os tissé* (woven bone) est un type d'os retrouvé lors de la croissance ou dans certaines maladies caractérisées par une croissance trop rapide de l'os. Il est plus cellulaire que l'os normal, et les lamelles sont disposées de façon désorganisée et aléatoire. C'est le premier type d'os formé qui disparaît normalement après le remodelage (71).

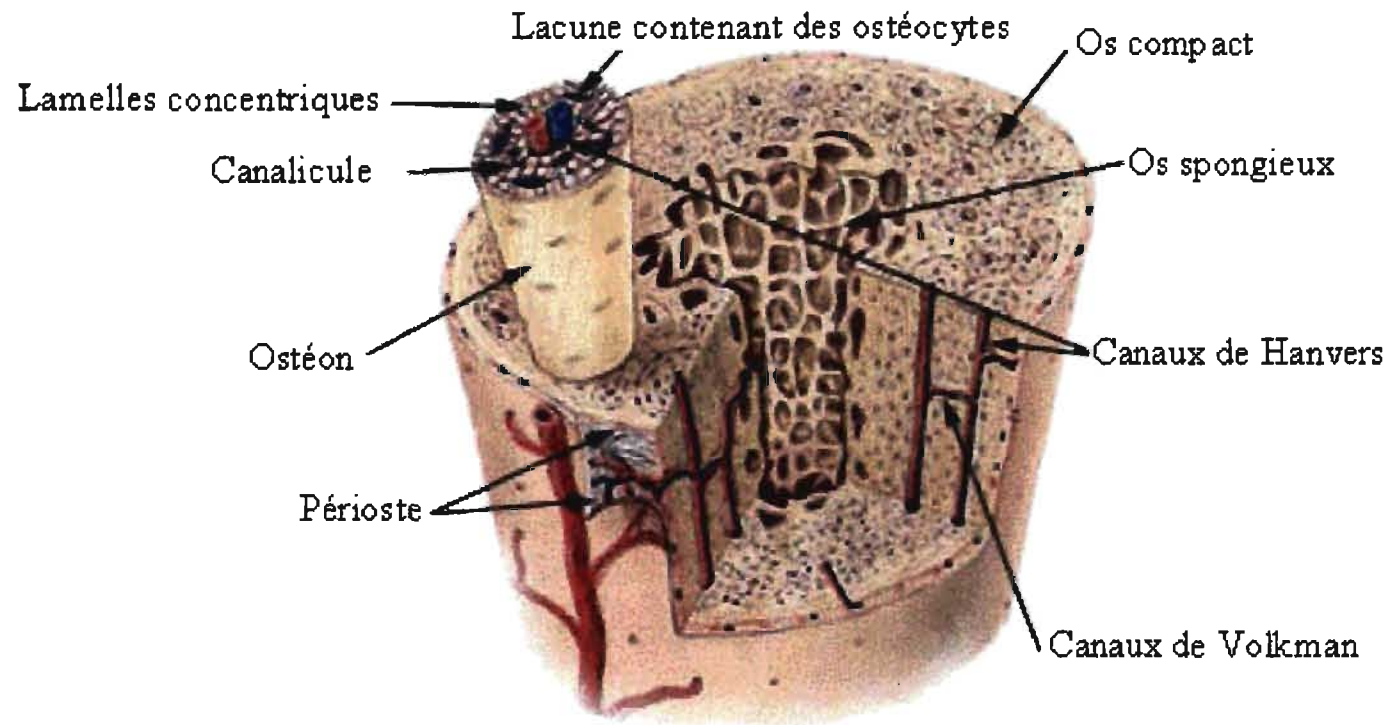


Figure 4: Représentation des structures microscopique de l'os. Image provenant du site SEER's Training Web Site, (http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html) par le US National Cancer Institute.

1.3,2- POPULATIONS CELLULAIRES

Quatre types cellulaires sont trouvés dans l'os. Les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes de l'os proviennent de la lignée cellulaire mésenchymateuse et les ostéoclastes qui proviennent de la lignée hématopoïétique.

Les *ostéoblastes* proviennent des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la crête neurale (70). Elles sont initialement localisées sur la face interne du périchondre, la membrane qui recouvre le modèle cartilagineux. Lors de l'invasion du modèle cartilagineux par des vaisseaux sanguins, des pré-ostéoblastes passent dans le cartilage (77). Lorsque le cartilage se sera transformé en os, le périchondre deviendra le périoste, (78) et les ostéoblastes logés à sa face interne permettront la croissance axiale de la diaphyse par ossification endo-membranaire. Les ostéoblastes sont des cellules avec un seul noyau qui se trouvent habituellement en monocouche à la surface de l'os, à la façon des cellules épithéliales. Elles sont reliées entre elles par des jonctions communicantes (*gap junction*) et ont une grande quantité d'organelles (Golgi, réticulum endoplasmique, mitochondries, ribosomes) qui témoignent d'un niveau élevé de synthèse protéique. Elles vont ainsi synthétiser la matrice organique de l'os. Habituellement, la matrice sécrétée par les ostéoblastes ne sera calcifiée qu'après leurs passages mais certains se retrouvent enchâssés dans la matrice qu'ils ont produite et deviendront des *ostéocytes*. Étant donné que le niveau d'activité métabolique des ostéocytes est très inférieur à celui des ostéoblastes actifs, ces cellules ont moins d'organelles et un moins gros noyau. Ils ont cependant des prolongements cytoplasmiques très étendus qui leur permettent de communiquer entre eux en passant par le réseau de canalicules très élaboré de l'os. Ce réseau canaliculaire permet aussi de nourrir les cellules par le passage de liquide extracellulaire (74; 78).

D'autres ostéoblastes entreront en apoptose ou se transformeront en cellules bordantes. Les cellules bordantes de l'os (*bone-lining cells*) sont des ostéoblastes quiescents qui recouvrent la surface osseuse qui n'est pas en remodelage. Elles sont en contact avec les ostéocytes par des jonctions communicantes (71; 74).

Les *ostéoclastes* dégradent le tissu osseux. Ils proviennent des cellules souches hématopoïétiques qui se différencient en pré-ostéoclastes. La différenciation des cellules progénitrices en ostéoclastes fonctionnels demande la participation d'un signal médié par le RANK ligand qui provient des ostéoblastes (42). Ce signal peut être induit par la PTH et par le calcitriol selon différentes conditions pathophysiologiques (37; 41).

Ces cellules sont étroitement associées à la surface osseuse par leur face apicale qui forme une bordure en brosse. Des pompes produisent alors un milieu acide propice à la solubilisation du sel calcifié; la matrice organique ainsi exposée est digérée par des enzymes produites par ces cellules (70).

Des ostéoclastes résorbent l'os cortical et d'autres l'os spongieux. Ces cellules sont semblables en tout point mais elles répondent différemment à certains stimuli. Cette observation laisse supposer un niveau supplémentaire de différenciation (79). Par exemple, l'hyperthyroïdie entraîne une résorption marquée de l'os cortical mais une faible perte trabéculaire (80).

1.3.3- DÉSÉQUILIBRE DE L'OS EN CROISSANCE

Deux pathologies sont principalement liées à la carence nutritionnelle ou fonctionnelle en vitamine D ; le rachitisme et l'ostéomalacie. Le rat comme l'humain peut être atteint de ces pathologies de façon semblable. Cependant, il est possible chez l'animal de laboratoire de séparer les pathologies par une modification du régime

alimentaire. Cette caractéristique sera mise en évidence par le modèle animal utilisé dans cette étude.

Ostéomalacie

L'ostéomalacie est un défaut qui affecte la minéralisation de l'os. Habituellement, la matrice synthétisée par les ostéoblastes est minéralisée entre cinq à dix jours après sa déposition (81). Lors de l'ostéomalacie, la nouvelle matrice faite à la suite du remodelage n'est plus minéralisée (ou l'est plus lentement) ce qui provoque une augmentation de la proportion de matrice non minéralisée. La pathologie peut affecter autant les adultes que les enfants, et autant la matrice apposée suite au remodelage que la matrice apposée lors de la croissance de l'os. Dans ce dernier cas, les enfants atteints souffrent de rachitisme.

L'ostéomalacie cause des symptômes comme une douleur osseuse diffuse, une faiblesse musculaire généralisée et une augmentation du risque de fracture (3). La déficience en phosphore et en calcium est la cause de l'ostéomalacie (82). Cette déficience est très souvent secondaire à une carence en vitamine D. L'insuffisance rénale, en diminuant la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et en modifiant l'excrétion des métabolites de la vitamine D, augmente le risque de souffrir d'ostéomalacie (83). L'augmentation de la concentration sérique de PTH, en augmentant le « *turn-over* » de l'os, accélère et également aggrave la pathologie.

Rachitisme

Le rachitisme est une maladie qui affecte le cartilage de croissance. Il est histologiquement caractérisé par une désorganisation et un élargissement du cartilage de croissance. À long terme, il provoque aussi une ostéomalacie, soit un défaut dans la minéralisation osseuse. Dans un modèle de rachitisme chez la souris, il a été montré

que l'absence du VDR, lorsqu'il était compensé par un régime alimentaire qui maintenait des niveaux normaux de calcium et de phosphore, ne provoquait pas l'apparition du rachitisme (84). Une série d'expériences réalisées par le laboratoire de Demay (85-87) a montré que l'hypophosphatémie était responsable de l'apparition du rachitisme chez l'espèce murine. En effet, une caspase médiant l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques est activée par le phosphore (86). Ainsi, la diminution des niveaux de phosphore dans le liquide extra-cellulaire empêche la mort cellulaire programmée des chondrocytes hypertrophiques. L'accumulation de ces cellules explique l'augmentation de l'épaisseur du cartilage de croissance que l'on constate lors du rachitisme.

Les symptômes du rachitisme peuvent affecter l'os de toutes sortes de façon : retard dans la fermeture des fontanelles du crâne, élargissement de la jonction costochondrale, déformation des os qui supportent le poids du corps, élargissement caractéristique du crâne, retard de croissance et augmentation du risque de fracture. Des problèmes au niveau musculaire et dentaire peuvent également apparaître (74).

1.4-L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

L'ossification endochondrale est « un processus d'ossification passant par un stade intermédiaire cartilagineux »¹². Elle débute *in utero* et se poursuit jusqu'à l'arrêt de la croissance des os longs.

Ce support cartilagineux, comme tout le tissu cartilagineux est dépourvu de circulation sanguine et n'est pas innervé. Il est nourri par le périchondre, la membrane conjonctive qui l'entoure. Le modèle de cartilage apparaît chez l'humain vers la cinquième semaine de grossesse (77). Il croît autant par la multiplication des

²² Citation provenant du *Grand dictionnaire terminologique* sous le terme ossification endochondrale (www.granddictionnaire.com).

chondrocytes que par la production de nouvelle matrice cartilagineuse. Puis le périchondre forme un manchon osseux autour de la diaphyse, par ossification endomembranaire. Simultanément à l'apparition de cet os, le cartilage de la diaphyse montre des changements ; des chondrocytes du centre s'hypertrophient et ils se mettent à sécréter des facteurs angiogéniques. Ces facteurs attirent des vaisseaux sanguins qui apportent avec eux des cellules ostéoblastiques, ostéoclastiques et hématopoïétiques. C'est la formation du centre d'ossification primaire. Les chondrocytes hypertrophiques entrent alors en apoptose et les ostéoblastes s'apposent sur la matrice cartilagineuse de la matrice osseuse. Cette matrice d'os immature sera rapidement dégradée par les ostéoclastes et de l'os spongieux sera formé. Peu de temps après l'apparition des centres primaires d'ossification, des centres secondaires d'ossification apparaissent dans les épiphyses et cela selon le même processus (88).

Les centres d'ossification vont s'étendre, sans toutefois se rejoindre. En effet, une bande de cartilage demeure entre les épiphyses et la diaphyse : c'est le cartilage de croissance ou cartilage de conjugaison. Il permettra la croissance longitudinale, l'os nouveau se trouvant dans la métaphyse, du côté de la diaphyse (70).

Le cartilage de croissance est nourri par le périchondre ainsi que par le réseau de vaisseaux sanguins qui irrigue la métaphyse et l'épiphyse. Dans le cartilage de croissance, les chondrocytes forment une structure bien organisée dans laquelle on distingue quatre zones principales (voir la figure 5):

La zone la plus proche de l'extrémité de l'os est la zone de réserve ; elle contient des chondrocytes au repos dans une matrice de cartilage hyalin. La zone proliférative montre les colonnes de cellules caractéristiques. Les chondrocytes de cette section se multiplient rapidement et produisent de la matrice qui est principalement formée de collagène de type 2 (Col2a). C'est la zone qui permet l'allongement de l'os. Les

cellules deviennent ensuite des chondrocytes hypertrophiques. À cette étape, leur division cesse, elles se mettent à grossir et la lacune grossit également et leur cytoplasme accumule du calcium. À ce moment, le type de protéine sécrété change ; le collagène de type X (ColX) et la phosphatase alcaline deviennent prédominants. La minéralisation de la matrice extracellulaire se produit également à ce stade (89). Finalement ces cellules vont mourir par apoptose et le calcium contenu dans leur cytoplasme sera re-largué dans la matrice qui les entoure (74; 90).

Parce que ce processus est étroitement régulé, lorsque les chondrocytes meurent, ils ont atteint le bas du cartilage de conjugaison, soit la partie juste au-dessus de la métaphyse. Un chimiotactisme va alors entraîner l'arrivée de vaisseaux qui vont contribuer à la vascularisation de la zone, à la déposition d'ostéoblastes et à l'arrivée d'ostéoclastes. Selon le même schéma que ce qui s'était produit dans le centre d'ossification primaire, les ostéoclastes vont alors dégrader la matrice cartilagineuse et les ostéoblastes vont apposer une matrice osseuse qui sera éventuellement calcifiée. Ici aussi le remodelage va permettre de bonifier l'organisation de la matrice (69; 71).

Tous ces événements exigent une très grande coordination entre les divers éléments impliqués dans l'ossification endochondrale tout au long du processus ; le résultat est que l'apparition de nouveau cartilage se fait à la même vitesse que l'ossification ce qui permet au cartilage de croissance de garder la même épaisseur tout au long de la croissance. Cette coordination est possible par la régulation de deux étapes. Premièrement, la maturation des chondrocytes, qui permet à une certaine proportion de cellules de se différencier et de cheminer tout au long du cartilage. Deuxièmement de l'autre côté du cartilage, la vascularisation qui permet l'arrivée des ostéoblastes et des ostéoclastes et la transformation du cartilage en os. Cette coordination est créée par une multitude de signaux endocrines, paracrines ou

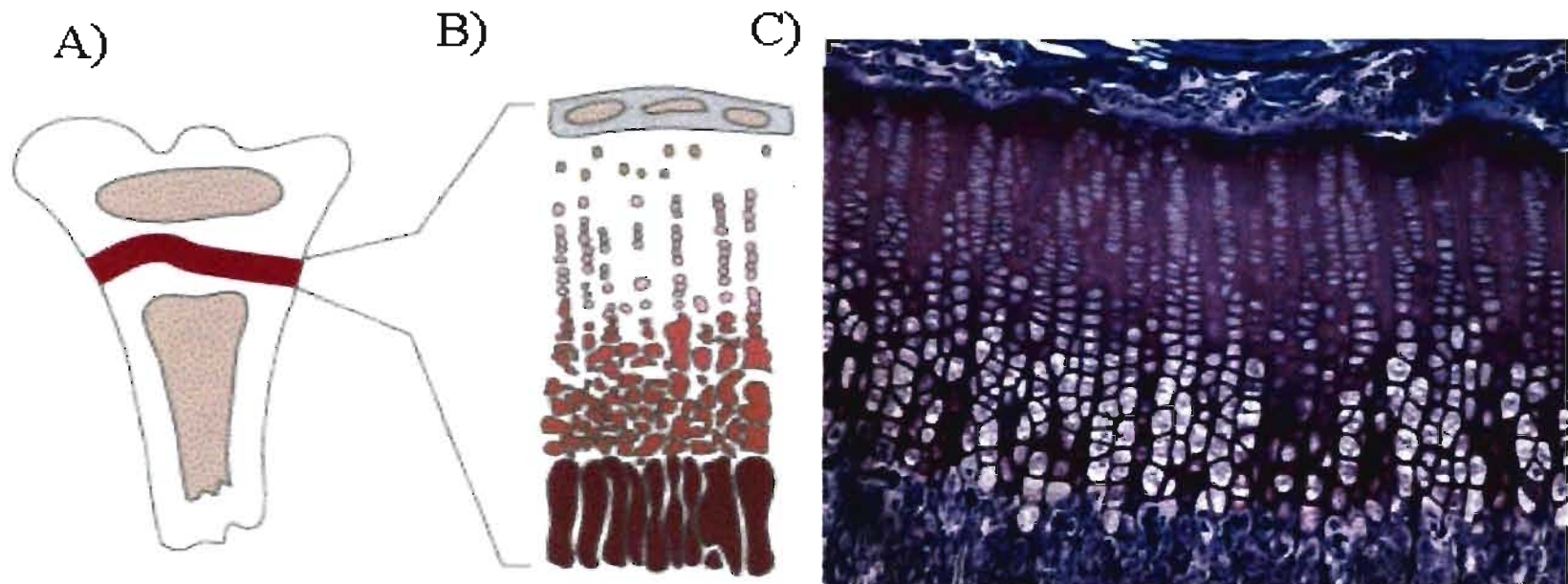


Figure 5: Représentation du cartilage de croissance A) Localisation schématique. B) Représentation schématique C) Représentation histologique. Tiré de A et B) "Pfizer growth hormone education" www.genotropin.nu/templates/Page_197.aspx C) "Upstate Medical University: Musculo-Skeletal Science research center" : www.upstate.edu/practice/ortho/research.shtml

autocrines (69; 88). Ces deux étapes et les facteurs les plus importants seront revus de façon plus détaillée à la section 1.4.1 et 1.4.2.

À la fin de la croissance, les chondrocytes du cartilage de croissance cessent de se multiplier et le front d'ossification dans la métaphyse se hissera jusqu'à l'épiphyse, entraînant ainsi la disparition du cartilage de croissance (90; 90). Le remodelage de l'os aura toutefois lieu durant toute la durée de la vie et permettra à l'os de s'adapter aux changements du mode de vie (apport en minéraux, exercice). L'équilibre entre la résorption et la production de l'os se maintiendra pendant un certain temps, mais la résorption finira par se faire plus importante et la masse osseuse diminuera avec l'âge.

1.4.1-GÈNES IMPORTANTS DE LA MATURATION CHONDROCYTAIRE

La maturation chondrocytaire est un phénomène essentiel de l'ossification endochondrale. Elle se traduit par la différenciation des cellules souches en chondrocytes, puis le changement de ces chondrocytes dans leur morphologie, les protéines excrétées et leur métabolisme énergétique jusqu'à leur différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques. De nombreuses molécules signalent l'état et la transformation de ces cellules; elles sont extrêmement nombreuses mais deux facteurs ont été choisis parce qu'ils intègrent les divers signaux et qu'ils représentent la maturation; l'un qui promeut la différenciation et la maturation précoce et l'autre qui aiguille les cellules vers la fin de la maturation, et conduit à l'hypertrophie.

SOX9

SOX9 est un facteur de transcription qui fut cloné initialement en 1994. On a, par la suite, mis en évidence qu'une mutation sur l'un des allèles de ce gène cause la dysplasie campomélrique. Les symptômes occasionnés par ce syndrome généralement létal affligent particulièrement le squelette, et dans le deux tiers des cas, il y a aussi un problème de différenciation sexuelle (91). La sévérité et le phénotype de la dysplasie

campomélique dépendent du type de mutation et de sa localisation. Chez les souris dont le gène est complètement inactivé, la maladie est létale dans la période périnatale.

SOX9 appartient à la famille SOX, acronyme de « *SRY-type HMG box* ». Tous les membres de cette HMG (*high mobility group*) box possèdent une séquence caractéristique de liaison à l'ADN. La protéine SOX9 possède aussi un domaine de trans-activation et un domaine de dimérisation (92; 93).

Le rôle de SOX9 dans la différenciation sexuelle est dû à son implication dans le développement des organes sexuels. Il est exprimé lors de l'embryogenèse et entraîne la différenciation des organes sexuels indifférenciés en phénotype mâle. Son expression chez les embryons femelles sera suffisante pour produire un phénotype mâle, et au contraire, l'absence de son expression dans un embryon mâle va entraîner un phénotype femelle (91; 94; 95).

Au plan squelettique, SOX9 est un régulateur majeur de la chondrogénèse. Il agit directement sur l'expression de gènes gérant la matrice extracellulaire et sur l'expression de d'autres facteurs de croissance actifs dans la chondrogénèse.

De façon directe, il est établi que SOX9 agit sur l'expression de plusieurs gènes exprimés par les chondrocytes : divers types de fibres de collagène (Col2a1, Col9a1, Col9a2, Col11a2, Col27a1) (92; 96-98) mais aussi d'autres protéines de la matrice cartilagineuse comme l'aggrecan1, le CD-rap et la CRT-LP (97; 99). Il le fait en se liant dans la séquence promotrice de l'ADN de ces gènes pour modifier leur expression.

SOX9 agit aussi sur la production d'autres facteurs de transcription essentiels à la chondrogénèse, SOX5 et SOX6. Ils sont co-exprimés lors de la différenciation des chondrocytes et SOX 9 est essentiel à leur expression (98; 100).

SOX9 est exprimé dès le moment où les cellules mésenchymateuses indifférenciées s'engagent dans la différenciation, puis lorsqu'elles sont au stade d'ostéoprogéniteurs. Lorsque ces cellules se condensent, on détecte l'expression de SOX5, SOX6 et SOX9. Les 3 gènes continuent à être exprimés chez les cellules différenciées jusqu'à un maximum d'expression au stade prolifératif. L'expression s'arrête complètement lorsque les chondrocytes deviennent hypertrophiques (92; 100; 100; 101).

Akiyama *et al.* en 2002 (100) ont montré par le système de recombinaison Cre/loxP, que lorsque l'expression de SOX9 cesse avant la condensation mésenchymateuse, il y a absence complète d'os et de cartilage. Lorsque cette expression est arrêtée après la condensation, les souris montrent une dyschondroplasie sévère et plusieurs cellules ne se différencient pas en chondrocytes. Cette expérience montre l'importance de l'expression de SOX9 dans la différenciation et la maturation des chondrocytes.

CTGF

CTGF (qui signifie *Connective Tissue Growth Factor*) est aussi appelé CCN2, Hcs24 et Ecogenin. Il fut découvert en 1989 chez la souris (89). C'est un facteur de croissance et un gène de type « immediate-early », c'est-à-dire qu'il fait partie de ceux qui sont rapidement exprimés après un stimulus. La protéine est glycosilée avant d'être excrétée via le système du Golgi (102).

Il fait partie de la famille des CCN, une famille de protéines dont les membres montrent une organisation en 4 domaines. À partir du bout N-terminal, on trouve un peptide signal pour l'excrétion, puis le domaine IGF-BP (*insulin growth-factor binding protein*), le domaine du facteur de Von Willebrand de type C, le *thrombospondin type 1* et finalement, à la partie carboxy-terminale se trouve le nœud

de cystéine (*cysteine knot*). Les quatre domaines permettent à la protéine d'interagir avec différentes molécules et d'intégrer les divers signaux (103). Dans les chondrocytes du cartilage de croissance, il a déjà été démontré que CTGF liait plusieurs molécules tels le perlecan (104), le TGF- β , BMP-4 et des intégrines (105).

Le CTGF est exprimé dans plusieurs types cellulaires. En plus des chondrocytes, les cellules de l'utérus, du système nerveux, des muscles, de la peau, du rein et les cellules endothéliales sécrètent à un moment ou à un autre le CTGF. Selon l'organe et le contexte (pathologie, embryogenèse, suppression tumorale, réparation tissulaire) où il est exprimé, le CTGF va engendrer des réponses différentes : chimiotaxie, angiogénèse, prolifération, adhésion et production de matrice extracellulaire, par exemple. Au niveau squelettique, c'est dans les chondrocytes hypertrophique qu'il est exprimé en condition normale.

CTGF agit de façon paracrine sur les chondrocytes pré-hypertrophiques, prolifératifs, les ostéoblastes et les cellules endothéliales vasculaires, produisant un effet différent selon les cellules sur lesquelles il agit (89). Des animaux dont les deux allèles du gène CTGF ont été inactivés ont été créés par Ivkovic *et al.* en 2003 (105) et permettent de voir l'effet sur les différents types cellulaires *in vivo*.

Les animaux CTGF $-/-$ meurent à la naissance et présentent une sévère dyschondroplasie, une ostéopénie, une petite taille, leurs os sont peu calcifiés, la composition de la matrice extracellulaire est changée et l'angiogénèse est moins avancée que dans les animaux normaux. L'apparition de ces défauts coïncide avec la période où CTGF commence à être sécrété, à l'époque où les chondrocytes hypertrophiques apparaissent, soit vers le 15^{ième} jour de développement embryonnaire (105).

CTGF est considéré comme un marqueur des chondrocytes hypertrophiques (104) parce qu'en condition physiologique, il n'est exprimé et sécrété dans l'os que par les chondrocytes du cartilage de croissance qui arrivent au stade hypertrophique (106). C'est d'ailleurs en raison de cette particularité qu'il a été utilisé dans cette étude.

1.4.2-LES GÈNES IMPORTANTS DE L'ANGIOGÈNÈSE

Depuis plusieurs décennies, la vascularisation a été reconnue comme un élément important dans la croissance. En effet, dès 1939, un article postulait l'existence d'un facteur stimulant la croissance de vaisseaux sanguins. En fait, de très nombreux facteurs agissent sur la vascularisation, en la promouvant ou en la réfrénant. Il se crée ainsi un équilibre physiologique dans chaque organe. Puisque le cartilage, une structure avasculaire, se transforme en os, une des structures les plus vascularisées du corps, l'équilibre est renversé du côté du cartilage près de la métaphyse. L'angiogénèse se produit à la fin de la maturation des chondrocytes, qui deviennent hypertrophiques. Un gradient de facteurs angiogéniques est établi dans la matrice extracellulaire; ce gradient attire par chimiotactisme les cellules ostéoclastiques qui dégradent le cartilage et les cellules endothéliales qui s'assemblent en vaisseaux et permettent l'arrivée de sang. Les chondrocytes meurent par mort cellulaire programmée (107) au même moment où des vaisseaux se forment du côté osseux de l'épiphyse et commencent à vasculariser la zone. Le lien entre la vascularisation et l'apoptose selon Shapiro *et al.* (108) serait le choc produit lors de la perfusion après la période d'ischémie que subissent ces cellules dans le cartilage non-irrigué. De façon semblable à ce qui survient dans les transplantations d'organes, les cellules entreraient en apoptose lors de la re-vascularisation. Cela expliquerait le lien entre la

vascularisation et la mort des chondrocytes dans les différents modèles animaux (109; 110).

Pour voir si la vascularisation est semblable entre les différents groupes d'animaux, nous avons ciblé le facteur de croissance principal de la vascularisation, VEGF et ses deux récepteurs ainsi qu'une enzyme qui dégrade la matrice et permet l'invasion des vaisseaux et la dispersion du VEGF.

VEGF

VEGF est un élément central dans la néo-vascularisation chez les mammifères. Son rôle a d'ailleurs été reconnu depuis longtemps puisque le premier rapport sur VEGF (*vascular endothelium growth factor*) fut publié en 1983 (111) (il est alors appelé *tumor vascular permeability factor*). Le VEGF est maintenant appelé VEGF-A pour le distinguer des autres membres de la même famille, nommés VEGF-B, -C, -D, -E et PlGF (112). C'est un facteur de croissance homodimère, (il forme parfois des hétérodimères avec VEGF-B, VEGF-C ou PlGF) qui lie deux récepteurs à activité tyrosine kinase, VEGFR1 et VEGFR2.

Les rôles du facteur de croissance VEGF sont nombreux. Les cellules cibles du VEGF sont celles qui forment les endothéliums vasculaires. Il agit sur ces cellules pour en promouvoir la division, ce qui crée des structures semblables à des capillaires dans le système artériel, veineux ou lymphatique. VEGF augmente aussi la survie de ces cellules tant *in vivo* qu'*in vitro*. Un autre effet majeur de VEGF est son habilité à produire une relâche des membranes vasculaires, engendrant aussi une augmentation de la perméabilité (112). Dans la moelle osseuse, le VEGF induit l'hématopoïèse par la formation de colonies de cellules progénitrices (112; 113).

Dans l'os, VEGF a été reconnu pour être essentiel à la vascularisation qui survient à la fin de la maturation des chondrocytes et qui permet la minéralisation

(114; 115). Lorsqu'il est séquestré par un anticorps chimérique, Gerber *et al.* (115) ont montré que la vascularisation sous le cartilage de croissance est diminuée alors que l'anticorps est largement séquestré dans la matrice, autour des chondrocytes hypertrophiques. Chez les souris dont le gène VEGF a été inactivé (110), on constate qu'en plus de montrer une diminution de la vascularisation, les chondrocytes montrent aussi une diminution de l'apoptose à la fin du cartilage de croissance. De plus, la vascularisation du cartilage de croissance semble être étroitement liée à l'ossification (110; 115; 116). Des souris chez lesquelles le gène VEGF a été inactivé dans les chondrocytes par le système Cre Lox, ces cellules montrent un taux de mort par nécrose beaucoup plus élevé que normalement.(110). Les chondrocytes dans lesquels le VEGF a été inactivé montrent une différenciation, une prolifération et une maturation normale mais un taux de survie plus faible (nécrose cellulaire) est observé (110; 112).

VEGF est exprimé fortement par les chondrocytes hypertrophiques et peu chez les chondrocytes au repos et prolifératifs (114; 115). L'expression par les ostéoblastes a été démontrée *in vitro* (117).

Suite à un épissage alternatif de l'ARN, la protéine de VEGF existe sous plusieurs formes moléculaires. Selon les différents épissages, les épiformes courtes vont être solubles et diffusées librement dans la matrice alors que les isozymes plus longues contiennent une ou plusieurs séquences de liaison à l'héparine et au sulfate d'héparane, un polysaccharide présent dans la matrice extracellulaire de l'os et sur les membranes cellulaires. Les isozymes contenant cette séquence seront enchassées dans la matrice après leur sécrétion par les chondrocytes. La forme liée à la matrice est nécessaire et suffisante à la vascularisation de la métaphyse (116). Les animaux qui expriment seulement une des formes liées ont une angiogénèse normale de la

métaphyse (116) alors que les animaux qui n'expriment que la forme soluble présentent les problèmes classiques liés à la vascularisation (117) ; élargissement de la zone des chondrocytes hypertrophiques et diminution de la quantité de vaisseaux dans la métaphyse, les mêmes symptômes que les animaux qui ont une absence complète de VEGF (110; 115). Pour permettre aux molécules de VEGF lié à la matrice de rejoindre les cellules cibles, elles doivent être détachées de la matrice ; ce relargage est principalement produit par MMP9 (118) (voir page suivante).

L'expression de VEGF est régulée principalement au niveau de la transcription par de nombreuses molécules qui agissent sur sa région promotrice. La stabilisation de l'ARN peut aussi contribuer à augmenter son expression (114).

Récepteur de VEGF

VEGF-A lie avec une haute affinité deux récepteurs à activité tyrosine kinase, le VEGFR1 et le VEGFR2. Les deux ont sept domaines « *immunoglobulin-like* » extracellulaires, qui comprennent le domaine de liaison au VEGF et le domaine de dimérisation. À l'intérieur de la cellule, le domaine TK est interrompu par un domaine d'insertion de kinase. Lors de la liaison au ligand, ces récepteurs forment des homodimères ou des hétérodimères (plus rarement) (112-114). Ils sont exprimés non seulement dans les cellules endothéliales, mais aussi dans les ostéoblastes (119) et les ostéoclastes (120). La régulation de ces deux récepteurs est modulée par de nombreux éléments de réponse dans leur région promotrice (121) ; l'hypoxie semble être un régulateur majeur de leur expression.

VEGFR1

Lors de sa découverte en 1992, il fut nommé Flt1 (pour *FMS like tyrosine kinase-1*). Il a une plus grande affinité que VEGFR2 pour le ligand. Lorsque VEGF lie le récepteur, la réaction d'autophosphorylation est faible ce qui a longtemps laissé

croire que le VEGFR1 était un leurre qui diminuait la proportion de VEGF qui lie VEGFR2. Sans contredire cette hypothèse, certaines études ont montré que VEGFR1 aurait un rôle dans l'hématopoïèse et la sécrétion de facteurs de croissance, mais n'aurait que peu d'influence pour le déclenchement des réponses habituellement associées à VEGF, soit l'angiogénèse, la migration et la survie cellulaire (112).

VEGFR2

VEGFR2 (aussi nommé KDR ou Flk1) a été découvert également en 1992. Il est le principal transducteur de signal positif dans l'angiogénèse physiologique et pathologique. Son signalement est nécessaire pour engendrer la différenciation des cellules épithéliales, induire l'effet de VEGF dans l'angiogénèse, la survie cellulaire et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux. Lorsque VEGF lie le KDR, celui-ci s'auto-phosphoryle, puis phosphoryle de nombreuses protéines intracellulaires. Les principales voies empruntées par VEGFR2 sont PLC qui active PKC et MAP-kinase pour engendrer les effets nommés précédemment.

MMP9

La matrice extracellulaire forme une grande partie du poids de l'os et puisqu'elle est un site intense de remodelage, l'expression de protéinases est élevée dans l'os en croissance. Bien que de nombreux types de protéinases soient présents, les MMP représentent la famille majeure par lesquelles l'os et le cartilage de croissance résorbent les éléments organiques de leur matrice (122). La famille d'enzymes *matrix metalloproteinases* dont fait partie MMP9 sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaire (123).

MMP9, avec MMP2 font partie des gélatinases, une sous-classe des métalloprotéases. Ce sont des protéines sécrétées qui agissent à pH neutre. Elles lient leurs substrats selon une séquence primaire spécifique et brisent la molécule. Ce

clivage permet d'activer et d'inactiver des molécules, d'en dégrader et de re-larguer certaines protéines qui étaient enchâssées dans la matrice (124). Spécifiquement, les principaux substrats de MMP9 sont les collagènes de type IV, V et XI, de nombreuses protéines non-collagéniques (*CRT-LP* et aggrecan, par exemple) et la gélatine, c'est-à-dire les fibres de collagène dénaturé (124). La dénaturation des fibres de collagène se produit spontanément lorsque des enzymes de type collagénase clivent les chaînes de collagène.

MMP9 n'agit donc pas seul dans le remodelage du cartilage de croissance; cependant elle a un rôle prédominant dans l'invasion sanguine de cette structure (109; 118; 125). Les souris MMP9^{-/-} en croissance montrent un retard dans la croissance des os longs, l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, l'invasion vasculaire et le recrutement des ostéoclastes. Le phénotype des souris déficientes en MMP9 est semblable à celui des souris déficientes en VEGF, quoique le phénotype soit moins prononcé.

Vu *et al.* (109) ont rapporté, lors de l'ossification endochondrale, l'expression de MMP9 par les ostéoclastes et les chondroclastes, les deux types cellulaires qui dégradent la matrice pour permettre l'ossification. L'expression a été rapportée par d'autres équipes dans les cellules endothéliales à la bordure inférieure du cartilage de croissance (126).

Le rôle de MMP9 dans la vascularisation est multiple. De façon directe, il agit sur le remodelage de la matrice. Mais il agit aussi indirectement, en permettant le re-largage de VEGF qui est enchâssé dans la matrice par les chondrocytes qui le produisent, ce qui rendrait le VEGF disponible aux cellules cibles (122; 123; 127). Cette hypothèse a été validée *in vitro* par Bergers *et al.* (118) à l'aide d'une lignée de cellules cancéreuses.

1.5-MODÈLE ANIMAL

1.5.1-LE RAT COMME MODÈLE ANIMAL D'OS LONG EN CROISSANCE

Le rat est abondamment utilisé dans les études sur la physiologie du système osseux. De nombreux auteurs (90; 128-130) s'accordent sur la pertinence de son utilisation dans l'étude de la physiologie de l'os en croissance. Les mécanismes qui contrôlent le gain ou la perte de masse osseuse sont généralement les mêmes que chez l'humain. La croissance des os longs du rat se fait aussi par ossification endochondrale et est suivie d'un remodelage qui forme l'os compact et spongieux. La croissance latérale origine du périoste et est semblable à celle retrouvée chez l'humain. De plus, il est aisé, vu sa petite taille et sa croissance relativement rapide, de vérifier l'influence des variables environnementales ou génétiques. Son utilisation comme modèle lors du vieillissement est cependant plus contesté. En effet, la fermeture des épiphyses du rat arrive proportionnellement plus tardivement que chez l'humain. De plus, le remodelage à l'âge adulte n'est pas aussi important chez l'humain que chez les rongeurs (130).

L'âge auquel les rats ont été utilisés dans cette étude (6-7 semaines au début du traitement) correspond à une période de croissance rapide chez le rat. En effet, la puberté étant classiquement fixée à 6 semaines, ces derniers sont alors en processus intense de fabrication d'os (130).

1.5.2-IMPACT DES RATIO CALCIUM : PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR LE MODÈLE ANIMAL DE RAT CARENCÉ EN VITAMINE D

Le modèle de rat carencé en vitamine D est utilisé par notre laboratoire depuis de nombreuses années, afin d'étudier les effets de l'hypocalcémie et de la carence chronique en vitamine D *in vivo* (131). Ce modèle de carence nutritionnelle en calcium et en vitamine D a l'avantage de permettre de varier facilement les apports en

calcium et en phosphore. De plus, l'installation de mini-pompes osmotiques dans la cavité péritonéale permet d'administrer une quantité déterminée de vitamine D ou d'un de ses métabolites.

Ce régime a des répercussions sur l'os et le cartilage de croissance. Les travaux de Mailhot *et al.* (132) ont montré qu'en absence de vitamine D dans la diète et sans synthèse endogène, il est possible de modifier l'état du cartilage de croissance en modifiant le ratio de calcium et de phosphore alimentaire. Les différents groupes utilisés dans cette étude montrent que, *in vivo*, une variété de phénotype osseux sont possibles. Les caractéristiques histologiques du cartilage de croissance des 6 groupes d'animaux, sont présentées à la figure 6.

Animaux carencés ou réplétés en vitamine D ayant un apport faible en calcium et en phosphore

L'histologie du groupe d'animaux carencés en vitamine D recevant un apport en minéraux faibles en calcium et en phosphore est présentée à la figure 6A. Chez les animaux de ce groupe (D-1,1 :1), l'os en croissance présente une ostéomalacie claire, caractérisée par une accumulation de tissus ostéoïdes. Dans notre étude, ce groupe sera utilisé comme groupe de référence pour les animaux carencés en calcium et en vitamine D (voir figure 7).

Les animaux du groupe D+ 1,1 :1 (figure 6B) ont été supplémentés en vitamine D sans augmenter l'apport en minéraux. On peut voir sur l'image qu'ils montrent un cartilage légèrement désorganisé mais sans qu'il soit épaissi ni qu'il y ait d'augmentation marquée du tissu ostéoïde. L'os cortical de ces animaux présente cependant un amincissement marqué.

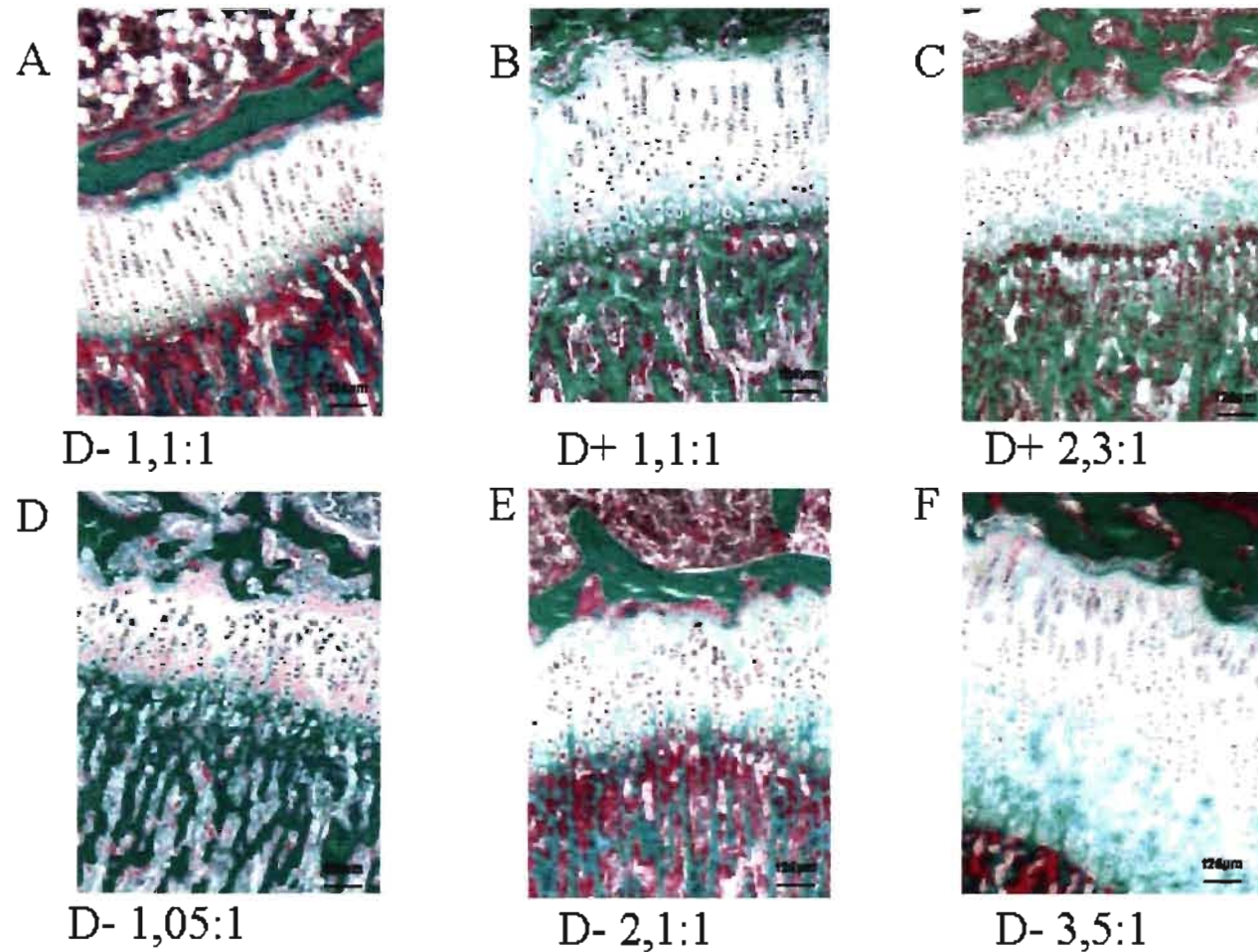


Figure 6: Histologie de cartilage de croissance de rats en fonction de la diète. A) Animaux carencés en vitamine D recevant un apport faible en Ca et en P, dont le ratio 1,1:1 B) Animaux réplété en vitamine D recevant un apport faible en calcium et en phosphore dont le ratio est de 1,1:1 C) Animaux réplétés en vitamine D recevant un apport normal en Ca et en P dont le ratio est de 2,3:1 D) E) et F) Animaux carencés en vitamine D recevant une diète présentant des ratios de Ca et de P de D) 1,05:1 E) 2,3:1 F) 3,5:1. Coloration GOLDNER-TRICHROME

Animaux réplétés en vitamine D ayant un apport normal en calcium et en phosphore

Les animaux du groupe D+ 2,3 :1 (figure 6C) ont un apport et un ratio de calcium et de phosphore qui sont normaux. Comme on le voit à la figure 6C, le cartilage de croissance redevient normal après quatorze jours de traitement. Dans notre étude, ce groupe sera utilisé comme groupe de référence pour le cartilage de croissance normal.

Animaux carencés en vitamine D ayant un apport élevé en calcium et avec un apport variable en phosphore.

Les animaux du groupe D-1,05 :1 (figure 6D) reçoivent pendant quatorze jours une quantité élevée de calcium et très élevée de phosphore, sans apport en vitamine D. Ce groupe montre un phénotype typique d'ostéomalacie. Les animaux du groupe D-2,1 :1 (figure 6E) reçoivent un apport élevé en calcium et en phosphore dont le rapport de concentration est normal (2,1 :1) mais sans supplémentation en vitamine D. Ce groupe, présente un phénotype quasi normal. En effet, le cartilage n'est pas aussi équilibré que celui des animaux du groupe D+2,3 :1 mais il s'agit du groupe dont l'os est le plus en santé malgré la carence en vitamine D.

Chez le groupe d'animaux D-3,5 :1 (figure 6F), l'apport en calcium a été augmenté, alors que l'apport en phosphore reste normal, produisant ainsi un ratio Ca :P élevé (3,5 :1). On observe que le cartilage de croissance de ces animaux carencés en vitamine D présente un épaissement du cartilage de croissance ainsi qu'une désorganisation des chondrocytes qui sont les principales caractéristiques du rachitisme.

1.6-HYPOTHÈSES ET BUTS

Le modèle animal d'hypocalcémie chronique présenté ci-haut montre qu'en absence de vitamine D, il est possible, en modifiant seulement l'apport en minéraux

contenu dans la diète, de guérir ou de modifier l'histologie du cartilage de croissance. De plus, la présence de vitamine D avec le même apport alimentaire en minéraux, influence, également, la pathologie associée à la carence. En considérant les résultats obtenus précédemment par Mailhot *et al.* (132), nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle l'expression des gènes de la maturation et de la vascularisation sera en relation avec l'état des chondrocytes hypertrophiques présents dans la plaque de croissance. Dans le cas des gènes de la maturation, nous pouvons nous attendre à ce que l'expression de *Sox-9* soit corrélée négativement à l'expression de *CTGF*. Il est également attendu que les gènes de la vascularisation seront exprimés plus fortement chez les groupes dont les chondrocytes hypertrophiques n'entrent pas ou peu en apoptose.

Le but de cette étude est donc de vérifier si la normalisation histologique du cartilage de croissance par la modification du ratio calcium :phosphore alimentaire est suivie d'une normalisation de l'expression génique de certains gènes types de l'ossification endochondrale ou s'il subsiste une différence d'expression afin de compenser pour la carence en vitamine D. Cette étude sera complétée par l'analyse histomorphométrique des cartilages de croissance des mêmes animaux, par le laboratoire du Dr Louis-George Ste-Marie. Ces résultats ne seront pas traités ici.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1-PRODUITS CHIMIQUES

La vitamine D₃ utilisée pour supplémer les rats provient de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, Ontario). La DNase (RNase Free DNase Set) et le RNeasy Mini Kit proviennent de Qiagen (Mississauga, Ont). Le FIRST-STRAND cDNA Synthesis Kit et le dCTP-[α -³²P] (Redivue déoxycytidine 5'-[α -³²P] Triphosphate, Triethylammonium Salt) sont d'Amersham Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, Québec). La trousse de purification de l'ADN et le mélange de TAQ prêt à l'emploi viennent de la compagnie Invitrogen (ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit et Platinum PCR SuperMix, Invitrogen, Mississauga, Ont). Tous les autres produits sont de qualité ACS ou supérieur.

2.2-MODÈLE ANIMAL DE RAT CARENCÉ EN CA²⁺ ET EN VITAMINE D

Pour vérifier l'influence de la carence en vitamine D et du déséquilibre du ratio calcium :phosphore alimentaire sur la santé osseuse, des rats hypocalcémiques, hyperphosphatémiques et carencés en vitamine D ont été utilisés. Ce modèle animal a déjà été établi depuis de nombreuses années dans notre laboratoire (131). Tous les animaux ont eu accès *ad libitum* à la nourriture et à la boisson et ont été logés dans un environnement dépourvu de tout rayonnement ultraviolet pour éviter la formation endogène de vitamine D. Dans le modèle animal utilisé, une rate allaitant une douzaine de ratons Sprague-Dawley mâles âgés de 5 à 7 jours (Charles-River

Laboratories, St-Constant, Québec) est soumise à une diète sans vitamine D et réduite en calcium et en phosphore élémentaire (respectivement 0,2 % et 0,18 %, ratio de 1,1 :1) accompagnée d'eau déminéralisée. Au sevrage, les rats reçoivent, à leur tour, cette même diète. Après 6 semaines sous cette diète, une mesure de calcium ionisé sérique est effectuée, et les animaux sont considérés hypocalcémiques lorsque le calcium ionisé sérique est égal ou inférieur à 0,85 mmol/L (valeur normale chez le rat : 1,2 mmol/L). Par la suite, les animaux sont séparés aléatoirement en six groupes.

2.3-DIÈTES ET TRAITEMENTS

La figure 7 schématise les diètes et traitements utilisés dans cette étude.

Le groupe de référence basale (D-1,1 :1) est maintenu sur la diète faible en calcium et en phosphore (respectivement 0,2% et 0,18%), sans vitamine D, accompagnée d'eau déminéralisée. Un autre groupe reçoit la même diète mais reçoit une supplémentation en vitamine D₃ grâce à une mini-pompe osmotique intra-péritonéale (Alzet MINI-OSMOTIC PUMP modèle 2002, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) qui dispense 6,5 nmoles/jour de vitamine D₃ durant les quatorze jours du traitement. C'est le groupe D+1,1 :1. Lors de l'implantation, une dose de charge de 3,25 nmol de D₃ est injectée dans la cavité péritonéale pour aider à rapidement atteindre l'état d'équilibre.

Le groupe D+2,3 :1 est le groupe de référence en santé. Son apport en vitamine D₃ est le même que celui du groupe D+1,1 :1, mais il reçoit un apport normal en calcium et en phosphore. La diète contient 0,36 % de calcium élémentaire et 0,18 % de phosphore élémentaire. De plus, ce groupe a accès à de l'eau contenant 0,5 % de gluconate de calcium, ce qui ajoute 0,0465 % de calcium disponible. Au total, ce

groupe reçoit donc 0,41 % de calcium, 0,18 % de phosphore (donc un ratio de 2,3 :1) et 6,5 nmol/jour de vitamine D₃.

Les animaux des trois derniers groupes ne reçoivent pas de vitamine D et sont soumis à une diète riche en calcium qui contient 0,36 % de calcium élémentaire et boivent de l'eau à laquelle a été ajouté 3 % de gluconate de calcium (0,279 % de calcium élémentaire) ce qui constitue un apport total de 0,639 % en calcium élémentaire. Par ailleurs, ils reçoivent des quantités variables de phosphore alimentaire. L'un des groupes reçoit un niveau élevé de phosphore dans la diète de 0,60% (ratio de 1,05 :1, groupe D-1,05 :1). Pour les deux autres groupes (D-2,1 :1 et D-3,5 :1) la quantité nette de phosphore dans la nourriture diminue respectivement à 0,30 % et à 0,18 %, ce qui modifie le ratio Ca:P (respectivement 2,1 :1 et 3,5 :1).

Au début du traitement (jour 0), puis aux jours 3, 7 et 14, les animaux sont pesés et une prise de sang est faite. Une partie du sang est utilisée pour mesurer le calcium ionisé sérique, puis le plasma est extrait et conservé à -80 °C.

Toutes les expériences menées sur les animaux l'ont été en conformité avec les normes du Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) qui sont en conformité avec les règles du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

Le tableau I présente les apports en calcium, en phosphore et en vitamine D selon les diètes utilisées et les ratios de calcium : phosphore de ces diètes. Finalement, la figure 7 schématise la description du modèle animal.

Tableau I

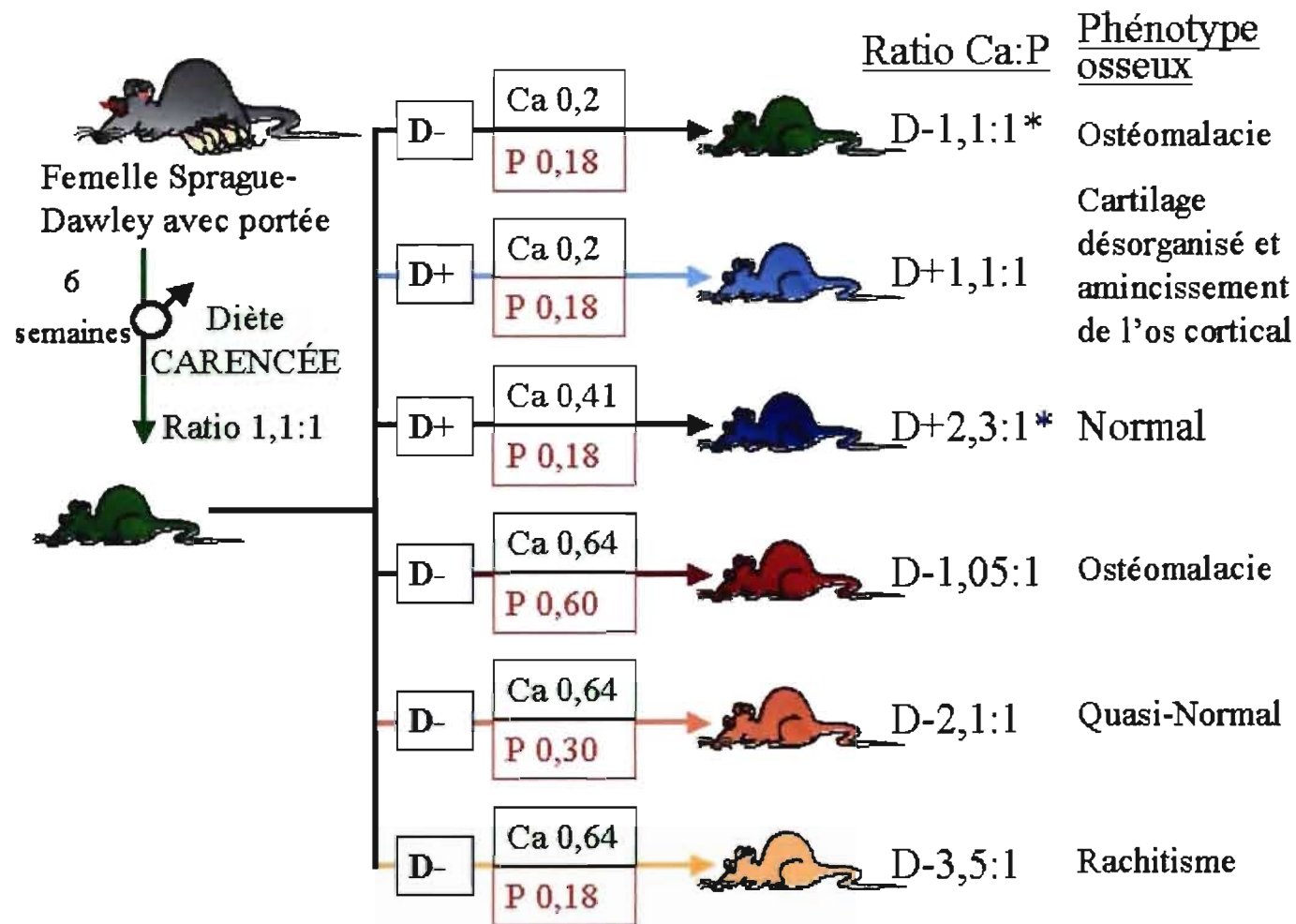
Quantité de calcium, phosphore et de vitamine D et ratio Ca:P dans la diète des différents groupes expérimentaux								
Groupes	Vitamine D, nm/j	Calcium, mM			Phosphore, mM			Ratio Ca:P total
		Diète	Eau de boisson	Total	Diète	Eau de boisson	Total	
D-1,1:1	0	0,2	0	0,2	0,18	0	0,18	1,1:1
D+1,1:1	6,5*	0,2	0	0,2	0,18	0	0,18	1,1:1
D+2,3:1	6,5*	0,36	0,0465	0,41	0,18	0	0,18	2,3:1
D-1,05:1	0	0,36	0,279	0,639	0,6	0	0,6	1,05:1
D-2,1:1	0	0,36	0,279	0,639	0,3	0	0,3	2,1:1
D-3,5:1	0	0,36	0,279	0,64	0,18	0	0,18	3,6:1

Légende :

* : Ces animaux ont reçu une dose de charge de 3,5nmol le premier jour du traitement

■ : Ce groupe est le groupe de référence basal de carence en calcium et en vitamine D

■ : Ce groupe est le groupe de référence normal compte tenu de la normalisation de son phénotype



Légende :

* :Groupe de référence basal de carence en calcium et en vitamine D.

* :Groupe de référence normalisé. Seul ce groupe à une diète normale.

FIGURE 7 SHÉMA DES MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS

2.4-PRÉLÈVEMENT DES PLAQUES DE CROISSANCE

Les animaux sont sacrifiés par exsanguination sous anesthésie à l'Isoflurane (Abbott Laboratories Limited, Montréal, Québec) quatorze jours après le début du traitement. Lors du sacrifice, un grand volume de sang est prélevé pour l'analyse du calcium, du phosphore, des métabolites de la vitamine D et de la PTH.

Lors du sacrifice, les pattes postérieures de l'animal sont prélevées rapidement. Pour atteindre les plaques de croissance distale du fémur et proximale du tibia, les deux os longs sont séparés l'un de l'autre en enlevant tous les tissus qui les retiennent ensemble dont la capsule articulaire, les muscles et les tendons. On ne conserve finalement que les os et leurs cartilages articulaires. Le tibia et le fémur sont alors coupés le plus loin possible de la plaque de croissance désirée, et le segment d'os est placé rapidement dans l'azote liquide et congelé à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

2.5-EXTRACTION ET ANALYSE DES ARN DES PLAQUES DE CROISSANCE

La plaque de croissance est faiblement visible sur la partie postérieure de l'os où l'on aperçoit le cartilage qui forme une mince ligne. On coupe donc au-dessus et en dessous de cette ligne pour enlever d'une part l'os et la moelle osseuse et, d'autre part, le cartilage articulaire et le centre d'ossification secondaire. On extrait de cette tranche de cartilage les ARN totaux par la méthode à l'isothiocyanate de guanidine et au chlorure de lithium tel que décrit par Cathala (133; 133) avec les modifications de Lemay *et al.* (134). Les ARN sont finalement re-suspendus dans de l'eau traitée au DEPC, puis traités à la DNase (RNase Free DNase Set, Qiagen, Mississauga, Ont) à l'aide de la trousse RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ont) selon les instructions

du fabricant. Suite à ce traitement, l'ARN est mesuré par spectrophotométrie à 260 nm et à 280 nm et sa concentration est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{(\text{D.O.260 nm} - \text{D.O.280 nm}) * \text{facteur de dilution}}{10}$$

2.6-SYNTHESE D'ADNc ET PURIFICATION

Un microgramme (1µg) de l'ARN provenant des plaques de croissance est transformé par transcription inverse (RT) en ADNc en utilisant l'hexamère aléatoire pd(N)₆ comme amorce. La réaction est menée à 37 °C pendant 1 h. Le produit est alors purifié grâce au ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit selon les instructions du manufacturier. Le volume final est de 30 µL.

2.7-RÉACTION D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE

L'ADN complémentaire est amplifié pour les segments correspondant aux gènes *GAPDH*, *VEGF-A*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *CTGF*, *SOX9*, et *MMP-9* spécifique au rat selon des séquences publiées dans PubMed (135-139). Les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) et synthétisées par la compagnie Invitrogen (Mississauga, Ont). La description des amorces des différents gènes est présentée au Tableau II. Le mélange PCR de 50 µl est constitué de 45 µl d'un mélange prêt à l'emploi pour PCR, des amorces nécessaires (concentration finale de 0,2 µM) et de 4 µl de la réaction de transcription inverse. Pour évaluer la quantité d'ADN produite lors de l'amplification, la méthode du marquage radio-isotopique est utilisée en ajoutant 0,1 µL de (α³²P-dCTP) au mélange. L'amplification en chaîne par polymérase est faite dans un thermocycleur de type Hybaid Touchdown (Hybaid Limited, Ashford, UK).

L'amplification de tous les gènes commence par un cycle de dénaturation à 95 °C pendant 3 minutes (*hot start*). Le programme d'amplification proprement dit varie pour chaque gène (voir Tableau III). Le programme PCR se termine pour tous les gènes par une élongation finale de 10 minutes à 72 °C, puis 2 minutes à 52 °C. Après le PCR, la réaction est mise sur gel de polyacrylamide 8% -TBE 1X non dénaturant. Le gel est séché, et exposé pendant 2 à 16 heures selon le gène. La quantification est faite par densitométrie à l'aide du logiciel COLLAGE (Fotodyne Inc, Hartland, WI, USA). L'expression génique est exprimée par le ratio *gène d'intérêt/GAPDH*.

2.8-ANALYSE DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES

2.8.1-ANALYSE DE LA 1,25(OH)₂ VITAMINE D :

La trousse d'analyse de la 1,25(OH)₂D par la méthode ELISA de la compagnie Alpco Diagnostics (Salem, NH, USA) a été utilisée. Ce dosage est précédé d'une extraction sur colonne (Chromabond et silice) de la 1,25(OH)₂D₃. Selon le principe de l'analyse immuno-enzymatique compétitif, le sérum à doser est incubé avec un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la 1,25(OH)₂D₃. Ce mélange est ensuite transféré dans les puits (d'une plaque 96 puits) au fond duquel est lié de la 1,25(OH)₂D₃. Seuls les anticorps qui ne se seront pas liés à la 1,25(OH)₂D₃ de l'échantillon pourront alors lier le fond de la plaque; après plusieurs rinçages, la quantité d'anticorps au fond des puits est mesurée par colorimétrie. La couleur (et donc la quantité d'anticorps) est inversement proportionnelle à la quantité de 1,25(OH)₂D₃ dans l'échantillon. Il ne reste que les anticorps qui n'étaient pas liés à la 1,25(OH)₂D₃ de l'échantillon et qui sont liés au fond des puits. Une courbe étalon est établie à partir des étalons inclus dans la trousse.

2.8.2-ANALYSE DE LA PARATHORMONE

La PTH a été mesurée grâce à la trousse Rat PTH IRMA Kit de la compagnie Alpco Diagnostics (Salem, NH, USA). Les deux anticorps de la trousse ciblent la région N-terminale de la protéine ce qui permet de reconnaître l'hormone dans sa forme intacte (1-84) ainsi que le bout N-terminal de la protéine tronqué (1-34). L'analyse est faite en suivant les instructions du fabricant. Chaque analyse comprend les contrôles internes inclus par Alpco Diagnostics et des contrôles inter-dosages en plus des échantillons.

2.8.3-ANALYSE DU PHOSPHORE

Le système Synchron LX (Beckman Coulter Canada, Ville St-Laurent, Québec) est utilisé pour doser le phosphore inorganique dans le plasma des animaux, selon la technique de dosage colorimétrique du phosphomolybdate. Cette analyse est faite par le personnel du département de biochimie clinique de l'hôpital St-Luc du CHUM.

2.8.4-ANALYSE DU CALCIUM IONISÉ

Le système Rapidlab 348 (Bayer HealthCare, Toronto, Ont) est utilisé pour doser le calcium ionisé dans le sang des animaux. Ce système utilise la technique de dosage électrochimique. Cette analyse est effectuée aux jours 0, 3 et 7 du traitement, ainsi que lors du sacrifice au jour 14.

2.9-ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse statistique STATVIEW (SAS, Cary, NC, USA). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et d'erreur type à la moyenne (*SEM*). L'effet de la diète a été

évalué par l'analyse de variance (ANOVA). Par la suite, les comparaisons intergroupes furent évaluées par le test de « t » de Student, qui a permis de décomposer les résultats présentant des différences significatives de l'ANOVA. Les résultats sont considérés significatifs à $p < 0,05$. Les groupes de références étaient les groupes d'animaux ayant reçu la diète carencée (D-1,1 :1) ainsi que le groupe d'animaux dont la calcémie, la phosphatémie et le statut en D étaient normalisés (D+2,3 :1).

Tableau II
Séquence des amorces et longueur des produits

Gènes		Séquence	Position dans la séquence	Référence
GAPDH	F R	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGGT GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG	176-201 645-623	(138)
VEGF-A	F R	GTACCTCCACCATGCCAAGT TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT	48-67 468-449	(135)
MMP9	F R	ACGGCAAGGATGGTCTACTG CCCTCGAAGATGAATGGAAA	548-567 890-871	(136)
VEGFR1	F R	TCCATTTGACGCTCTTACCC TTTGACCACGGAGGAATCTC	752-771 975-956	(140)
VEGFR2	F R	TGAAGCCATCAACAAAGCAG TTCTGGAATGCCACAATCAA	1826-1845 2128-2109	(137)
SOX9	F R	ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	131-150 394-375	(141)
CTGF	F R	GAGTCGTCTGCATGGTCA GCTTTACGCCATGTCTCCAT	917-936 1271-1252	(139)

Tableau III
Programme PCR des différents gènes

Gènes	Séquence	Nombre de cycle
CTGF	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	30X
VEGFR1	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	25X
VEGFR2	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	25X
GAPDH	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	20X
MMP9	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	20X
SOX9	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	30X
VEGF	95°C 30''/ 59°C 45''/ 72°C 1'30''	30X

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS

3.1-POIDS

La figure 8 présente les variations de poids des rats selon les groupes. Après quatorze jours d'exposition au régime alimentaire expérimental, les groupes D-1,1 :1 et D-1,05 :1 ont un poids significativement plus bas que tous les autres ($p < 0,0001$ entre D-1,1:1, D-1,05:1 et tous les autres groupes). Chez les trois groupes ayant un ratio Ca:P bas (D-1,1:1, D+1,1:1, D-1,05:1), le poids ne commence à augmenter de façon significative qu'après 7 jours (signification entre le jour 0 et le jour 7 de $p < 0,0001$ et $p < 0,01$ pour D+1,1:1 et D-1,05:1 respectivement) ou même 14 jours (changement significatif entre le jour 0 et le jour 14, $p < 0,0001$ pour D-1,1:1 et non significatif entre 0 et 7 jours) alors que les trois autres groupes ont une augmentation de poids statistiquement significative dès le troisième jour (entre le jour 0 et le jour 3; pour D-2,1:1 $p < 0,0001$, pour D+2,3:1 $p < 0,005$, pour D-3,5:1 $p < 0,05$). L'augmentation du poids des animaux en % du poids de départ est de 27% pour D-1,1:1, 31% pour D-1,05:1, puis 43, 44 et 46% pour D-2,1:1, D-3,5:1 et D+1,1:1 et finalement 51% pour le groupe D+2,3:1.

3.2-CALCÉMIE

La figure 9 présente la calcémie des animaux tout au long du traitement. Au jour 0, tous les animaux sont sévèrement hypocalcémiques (entre 0,70 et 0,80 mmol/L). Au quatorzième jour, les groupes D+1,1:1, D+2,3:1 et D-3,5:1 (1,20, 1,25 et 1,18 mmol/L respectivement) sont dans la zone de normocalcémie (entre 1,17 et 1,40 mmol/L), alors que les trois autres groupes sont demeurés hypocalcémiques (1,04,

Figure 8

Poids moyen des animaux en fonction de la diète

Évolution du poids moyen des groupes d'animaux au jour 0, 3, 7 et 14 selon le traitement reçu. Les résultats sont présentés par la moyenne et l'erreur type pour chacun des groupes. Les différents groupes sont représentés par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) (n=12), D+1,1:1 (□) (n=11), D+2,3:1 (○) (n=10), D-1,05:1 (●) (n=14), D-2,1:1 (▲) (n=10), D-3,5:1(◆) (n=13). Les données représentent la masse moyenne des animaux ayant de 6 à 7 semaines au début du traitement. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferroni/Dunn bilatéral. Les groupes qui servent de référence pour les changements sont D-1,1:1 et D+2,3:1 lors des comparaisons intergroupes et le jour 0 est utilisé lors des comparaisons intragroupes. Les relations statistiquement significatives indiquées sur la figure par le symbole * se réfèrent au groupe D-1,1:1 jour 14, alors que le symbole # se réfère au groupe D+2,3:1 jour 14. Finalement, le symbole † utilisé dans les comparaisons intragroupes se réfère au jour 0.

Figure 8

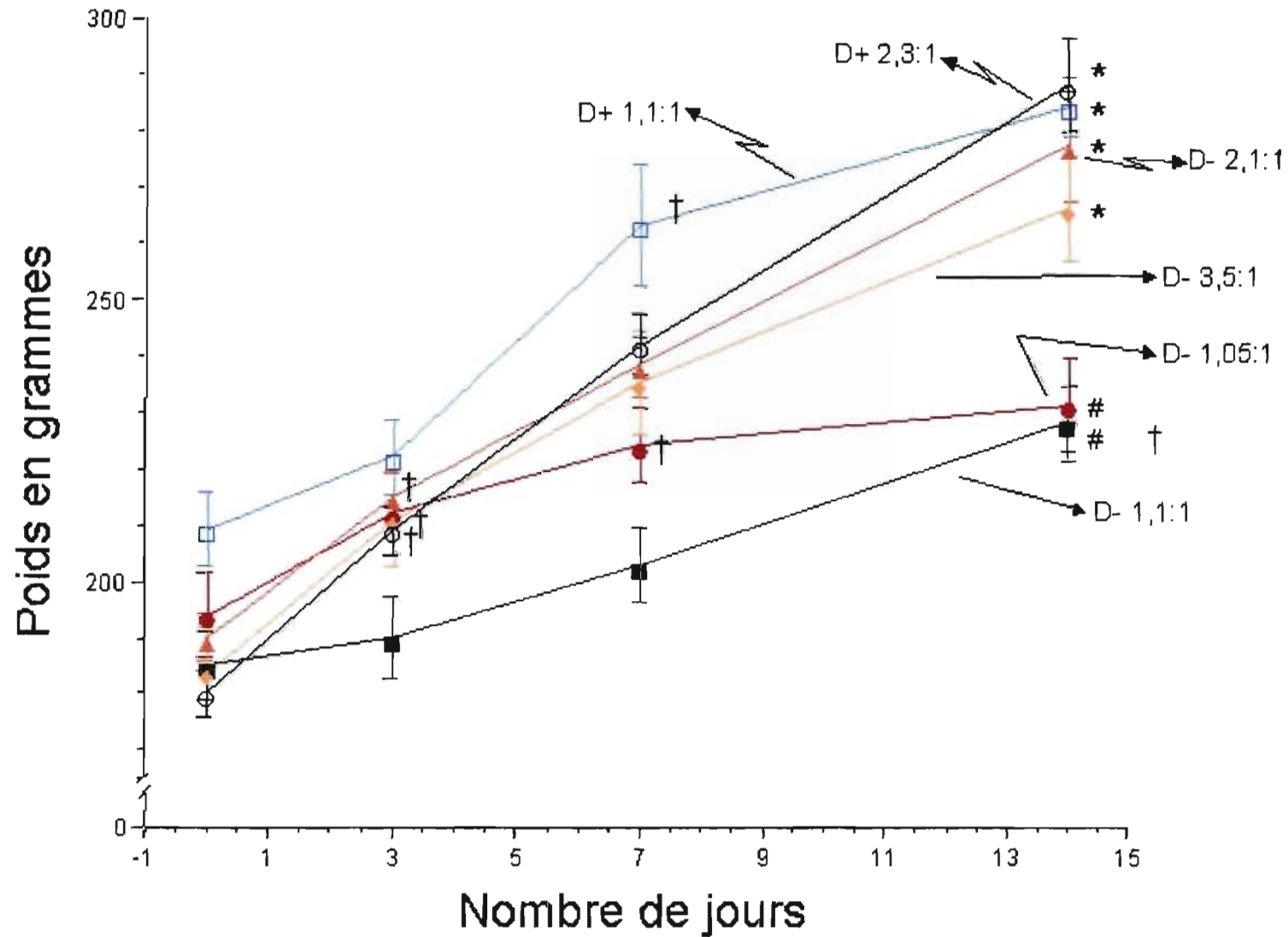
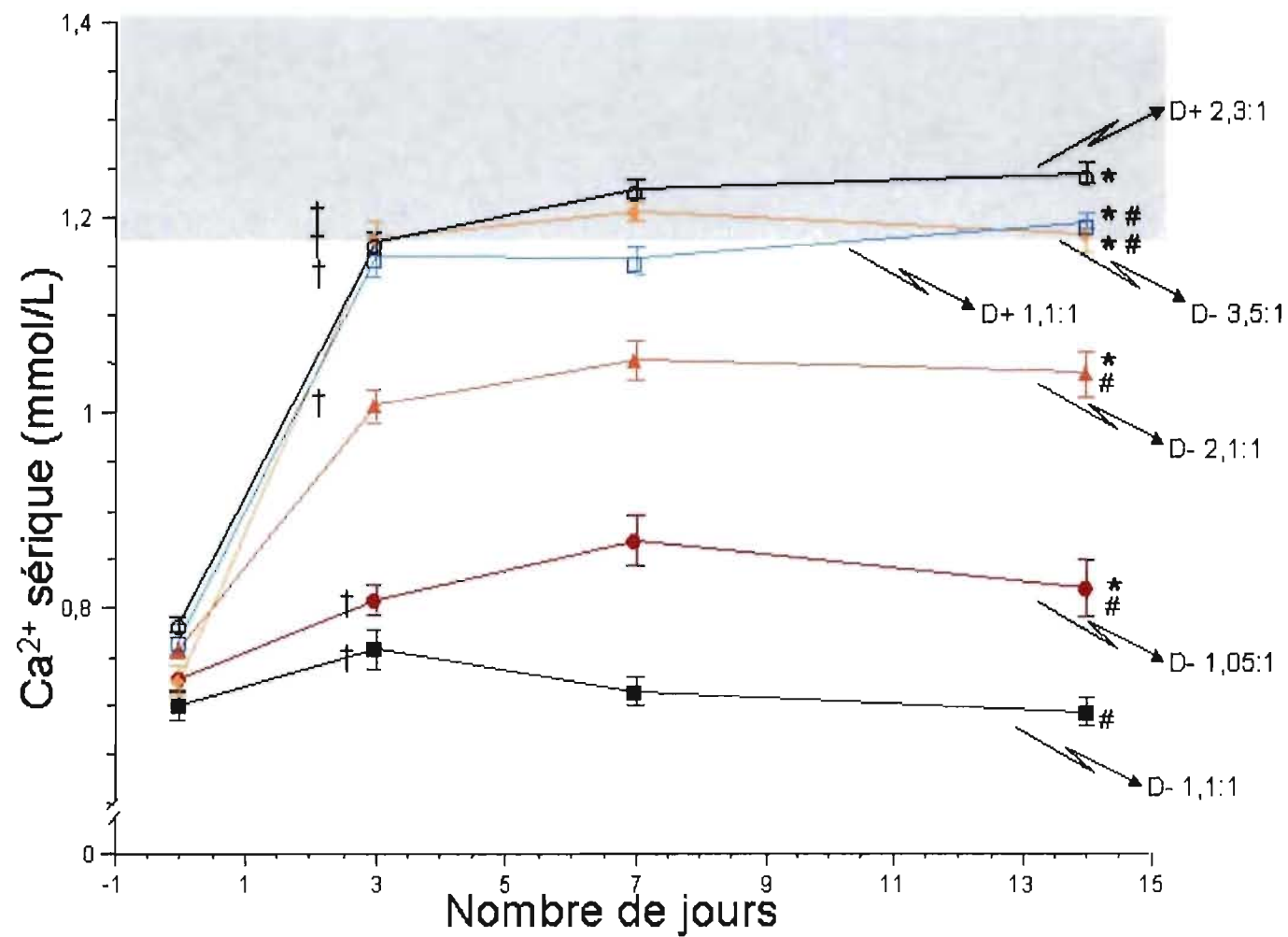


Figure 9

Calcémie moyenne selon le groupe

Concentration de calcium ionisé sérique chez les groupes d'animaux aux jours 0, 3, 7 et 14 du traitement. Les résultats sont présentés par la moyenne et l'erreur type pour chacun des groupes. Les différents groupes sont représentés par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) (n=10), D+1,1:1 (■) (n=11), D+2,3:1 (○) (n=10), D-1,05:1 (○) (n=14), D-2,1:1 (▲) (n=10), D-3,5:1(♦) (n=13). La zone grise représente la zone de normocalcémie pour les rats. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral. Les groupes qui servent de référence pour les changements sont D-1,1:1 et D+2,3:1 lors des comparaisons intergroupes et le jour 0 est utilisé lors des comparaisons intragroupes. Les significations statistiques indiquées sur la figure par le symbole * se réfèrent au groupe D-1,1:1 14d, alors que le symbole # se réfèrent au groupe D+2,3:1 14d. Finalement, le symbole † utilisé dans les comparaisons intragroupes se réfère au jour 0.

Figure 9



0,82 et 0,69 mmol/L pour D-2,1:1, D-1,05:1 et D-1,1:1 respectivement). Le groupe D-1,1:1 ne montre aucune variation significative dans la concentration sérique de calcium durant le traitement (non significatif entre le jour 0 et le jour 14), alors que les groupes D-2,1:1 et D-1,05:1 montrent, pour leur part, une augmentation statistiquement significative. Bien que ces augmentations soient significatives ($p < 0,0001$ lorsque comparées au groupe D-1,1:1/14 jour), elles ne permettent pas d'atteindre la normocalcémie.

3.3-PHOSPHATÉMIE

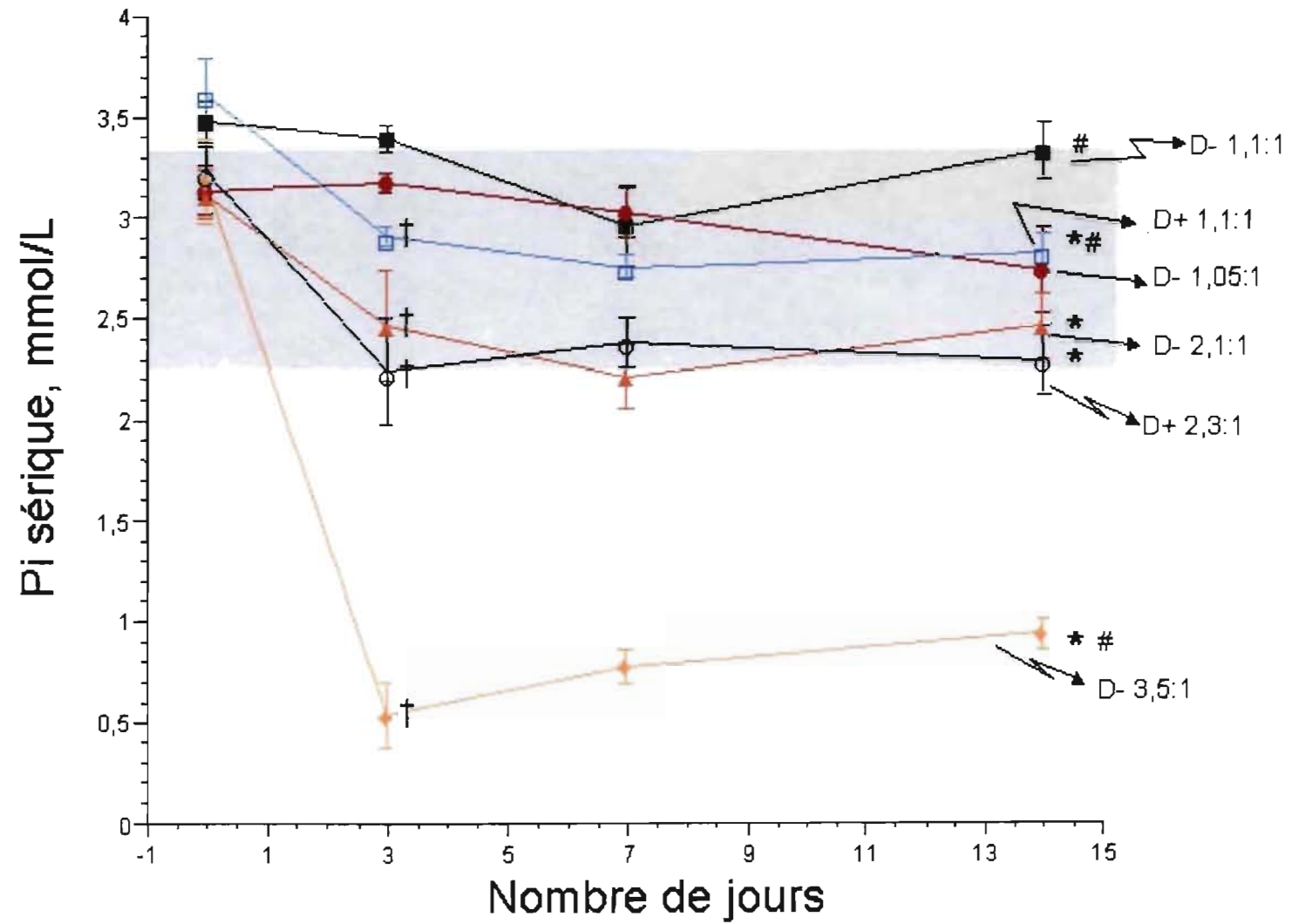
La figure 10 présente la phosphatémie des animaux des six groupes durant les 14 jours du traitement. Au départ, les animaux ont tous une phosphatémie à la limite supérieure de la normale (la normophosphatémie varie de 2,20 à 3,30 mmol/L et les valeurs des animaux expérimentaux se situent entre 3,12 et 3,61 mmol/L). La phosphatémie du groupe D-1,1:1 ne varie pas durant le traitement et reste élevée (jour 14: 3,33 mmol/L ce qui est statistiquement non significatif relativement au jour 0). Au 14^{ième} jour, les valeurs observées chez les animaux de ce groupe sont significativement plus hautes que celles observées chez tous les autres groupes. Pour le groupe ayant le même régime alimentaire mais supplémenté en vitamine D₃ (D+1,1:1), la phosphatémie diminue (2,83 mmol/L) jusqu'à en arriver à un écart significatif au jour 14 avec le groupe D-1,1:1 ($p < 0,01$). La même observation est faite pour les groupes D-1,05:1 (2,74 mmol/L ; $p < 0,05$), D-2,1:1 (2,46 mmol/L ; $p < 0,0005$) et D+2,3:1 (2,29 mmol/L ; $p < 0,0001$). Le groupe D-3,5:1 est celui dont la diminution de la phosphatémie est la plus remarquable, puisqu'en trois jours, sa valeur chute de plus de 5 fois pour terminer à 0,54 mmol/L ($p < 0,0001$ comparativement au groupe D-1,1:1 à 14 jours). D'ailleurs la plupart des corrections de la phosphatémie sérique se font

Figure 10

Phosphatémie moyenne selon le groupe

Concentration sérique de phosphore inorganique des groupes d'animaux aux jours 0, 3, 7 et 14 du traitement. Les résultats sont présentés par la moyenne et l'erreur type pour chacun des groupes. Les différents groupes sont représentés par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) (n=10), D+1,1:1 (□) (n=11), D+2,3:1 (○) (n=10 sauf j3 n=3), D-1,05:1 (●) (n=8), D-2,1:1 (▲) (n=10), D-3,5:1(◆) (n=13 sauf j3 n=4). La zone grise représente la zone de normophosphatémie chez les rats. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral. Les groupes qui servent de référence pour les changements sont D-1,1:1 et D+2,3:1 lors des comparaisons intergroupes et le jour 0 est utilisé lors des comparaisons intragroupes. Les significations statistiques indiquées sur la figure par le symbole * se réfèrent au groupe D-1,1:1 14d, alors que le symbole # se réfère au groupe D+2,3:1 14d. Finalement, le symbole † utilisé dans les comparaisons intragroupes se réfère au jour 0.

Figure 10



rapidement puisque chez tous les groupes où l'on remarque un changement, celui-ci survient après trois jours à l'exception du groupe D-2,1:1 qui nécessite 7 jours pour se stabiliser. Cette observation est en concordance avec la calcémie puisque ce groupe est le seul chez qui la calcémie change encore après 3 jours.

3.4-PARATHORMONE

La figure 11 illustre les concentrations de PTH sérique après 14 jours de traitement dans les 6 groupes d'animaux étudiés. Le groupe D-1,1:1 a une concentration de PTH élevée (852pg/ mL). L'autre groupe ne recevant pas de vitamine D et ayant un ratio Ca : P bas a lui aussi une concentration élevée de PTH sérique (700 pg/ml, N.S. par rapport à D-1,1:1). Tous les autres groupes montrent une relation statistiquement significative par rapport à D-1,1:1 ; D-3,5:1 (346 pg/mL, $p<0,001$), D-2,1:1 (534 pg/mL $p<0,05$), D+1,1:1 (105 pg/mL, $p<0,0001$), D+2,3:1 (157 pg/mL $p<0,001$). On observe que les deux groupes qui reçoivent de la vitamine D ont un taux particulièrement bas mais équivalent (N.S. entre D+1,1:1 et D+2,3:1). Le groupe de référence recevant de la vitamine D (D+2,3:1) atteint cependant une différence statistiquement significative par rapport à tous les autres groupes : D-1,05:1, $p<0,0001$; D-2,1:1 $p<0,05$; D-3,5:1 $p<0,05$.

3.5-1,25(OH)₂-VITAMINE D₃

Le métabolite actif de la vitamine D₃ n'a été mesuré que chez les groupes D-1,1:1, D+1,1:1 et D+2,3:1. Tel qu'illustré sur la figure 12, on voit que pour les groupes qui reçoivent de la vitamine D, le maximum de l'augmentation en 1,25(OH)₂ vitamine D₃ sérique se produit au troisième jours de traitement (pour D+1,1:1,

Figure 11

Concentration sérique de PTH moyenne selon le groupe

Concentration sérique moyenne de PTH des groupes d'animaux après 14 jours de traitement. Les résultats sont présentés par la moyenne et l'erreur type pour chacun des groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral. Les groupes de référence pour les comparaisons sont D-1,1:1 et D+2,3:1.

Figure 11

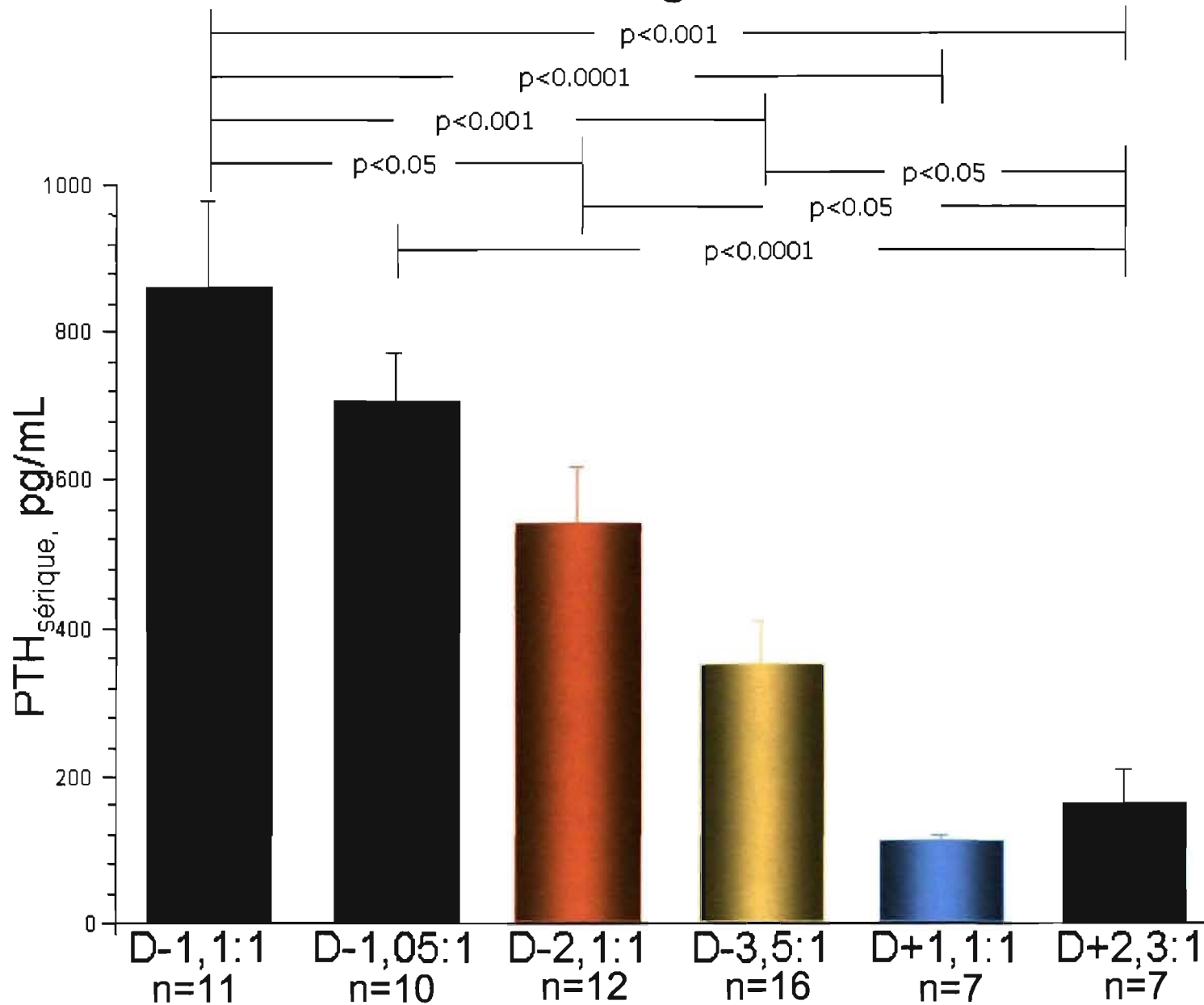
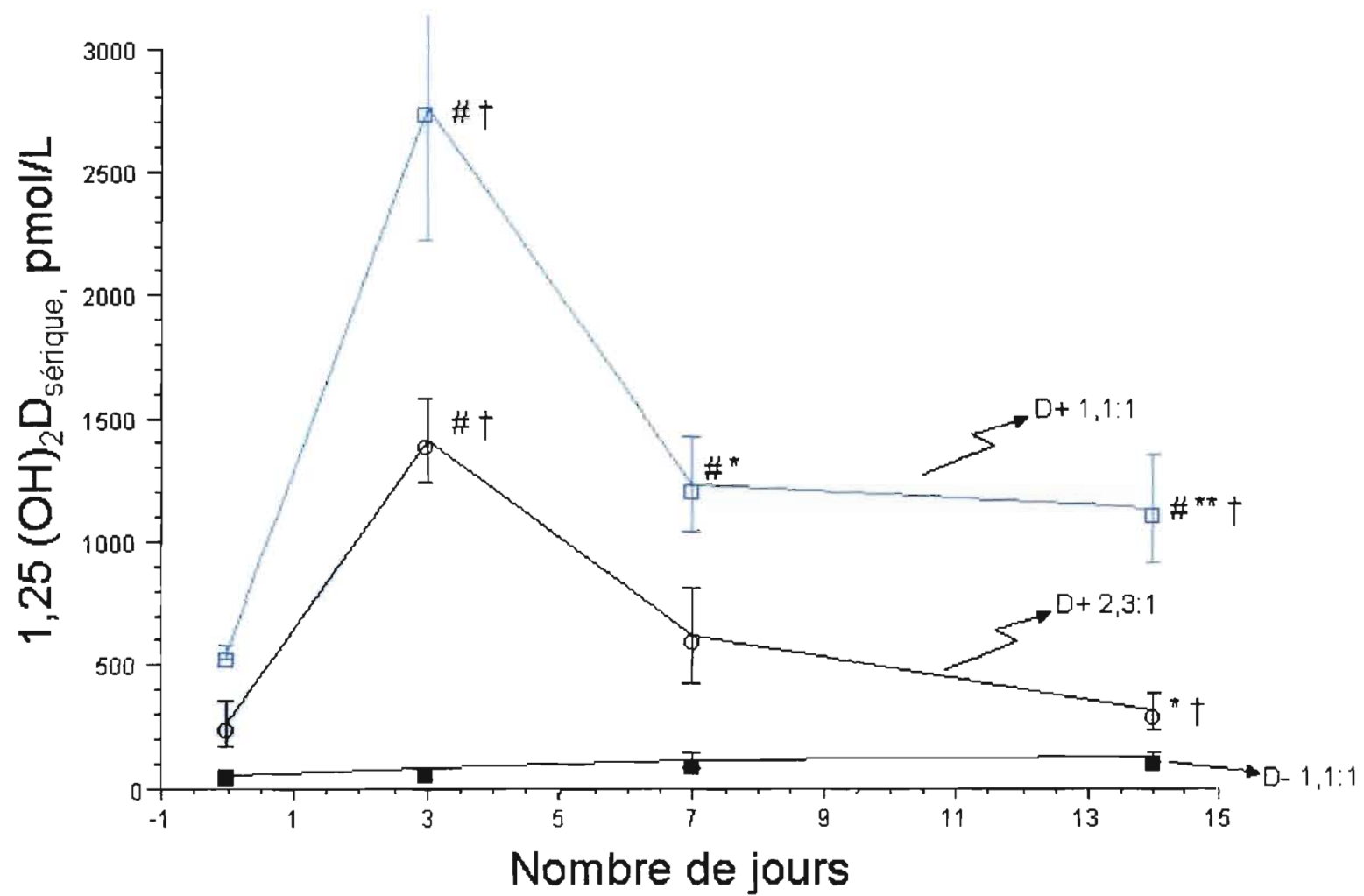


Figure 12

Concentration sérique moyenne de 1-25(OH)₂ vitamine D₃ selon le groupe

Concentration sérique de 1-25(OH)₂ vitamine D₃ sérique chez les groupes d'animaux aux jours 0, 3, 7 et 14 du traitement. Les résultats sont présentés par la moyenne et l'erreur type pour chacun des groupes. Les différents groupes sont représentés par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) (n= 3,3,3,9), D+1,1:1 (□) (n=3,5,12,11), D+2,3:1 (○) (n=3,10,11,12). Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral. Les groupes qui servent de référence pour les changements sont D-1,1:1 et D+2,3:1 lors des comparaisons intergroupes et le jour 0 est utilisé lors des comparaisons intragroupes. Les significations statistiques indiquées sur la figure par le symbole * se réfèrent au groupe D-1,1:1 14d, alors que le symbole # se réfère au groupe D+2,3:1 14d. Finalement, le symbole † utilisé dans les comparaisons intragroupes se réfère au jour 0.

Figure 12



2766 pmol/L, pour D+2,3:1 1409 pmol/L); après une semaine de réplétion, les concentrations se stabilisent à environ 1200 pmol/L pour le groupe D+1,1:1, et restent au même niveau jusqu'au quatorzième jour. Pour le groupe D+2,3:1, les concentrations continuent de descendre lentement au jour 7 (620 pmol/L) et 14 (313 pmol/L). Étonnamment, les concentrations sériques maximales en 1,25(OH)₂ vitamine D₃ du groupe D+1,1:1 sont significativement plus élevées que celles du groupe D+2,3:1, (à 3 jour, $p < 0,01$) et restent plus élevées pour toute la durée du traitement (à 7 jour $p < 0,05$ et à 14 jour, $p < 0,005$). À 14 jours, les deux groupes qui reçoivent de la vitamine D ont des concentrations sériques de 1,25(OH)₂ vitamine D₃ significativement différentes du groupe qui n'en reçoit pas (à 14d ; D+1,1:1 1141 pmol/L, D+2,3:1 313 pmol/L et D-1,1:1 126 pmol/L; différences entre D+1,1:1 et D-1,1:1 de $p < 0,0005$ et entre D-1,1:1 et D+2,3:1 $p < 0,05$).

3.6-RELATION CALCIUM / Δ_{0-14} POIDS

La figure 13 présente la relation entre la calcémie et la variation du poids entre le premier et le quatorzième jour (Δ_{0-14} poids); cette dernière est présentée sous forme d'une relation linéaire positive. En plaçant la calcémie comme variable indépendante, on constate que plus la calcémie est élevée à la fin du traitement de 14 jours, plus le changement de poids est prononcé entre le début et la fin du traitement. Cette relation montre un R^2 de 0,597 ($p < 0,0001$).

3.7-RATIO CALCIUM : PHOSPHORE SÉRIQUE DANS LES GROUPES NE RECEVANT PAS DE VITAMINE D.

La figure 14 montre la relation entre le calcium et le phosphore sérique au quatorzième jour du traitement, pour les 4 groupes n'ayant pas reçu de vitamine D

Figure 13

Corrélation entre la calcémie et le poids selon la diète

Régression simple entre la calcémie et le changement de poids des animaux entre le jour 0 et le jour 14. Chaque point représente un individu d'un des groupes et est représenté par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) n=15, D+1,1:1 (□) n=11, D+2,3:1 (○) n=10, D-1,05:1 (J) n=14, D-2,1:1 (▲) n=10, D-3,5:1 (◆) n=13. La relation entre la calcémie et le changement de poids peut-être définie à l'aide de l'équation suivante : $\text{Poids} = -15.7 + 90.2 * \text{Calcémie}$ ($p > 0,0001$).

Figure 13

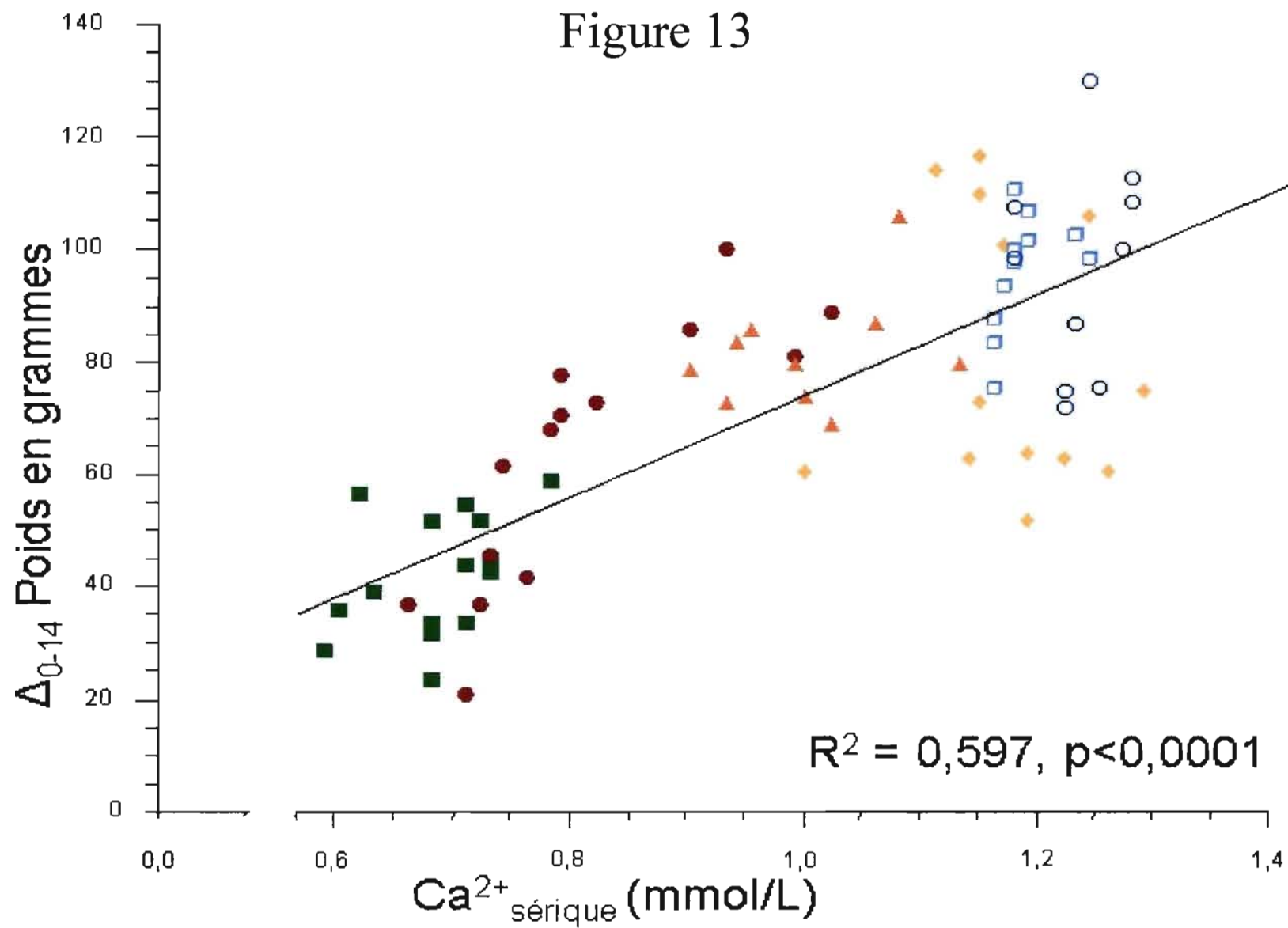
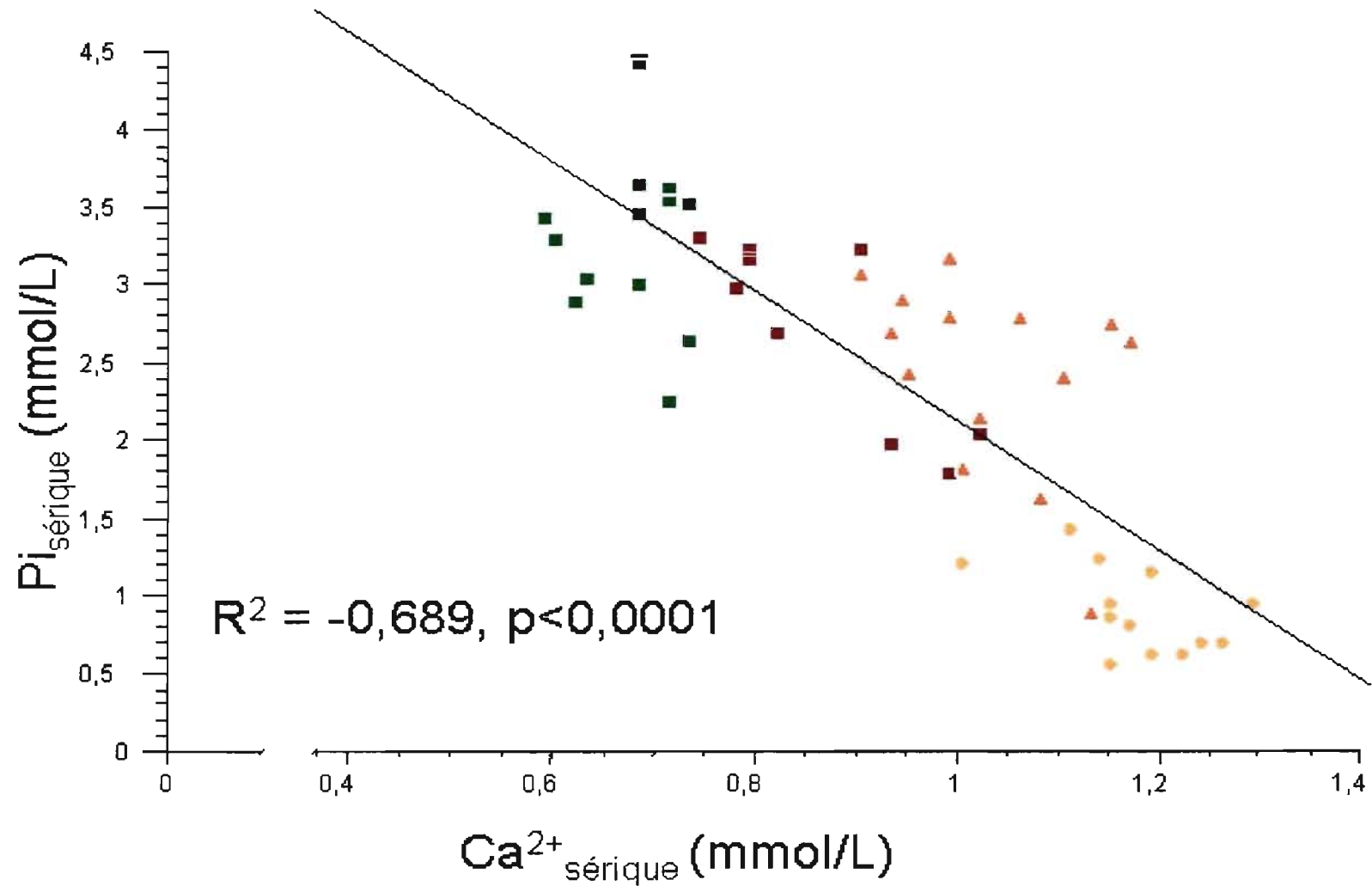


Figure 14

Corrélation entre la calciémie et la phosphatémie selon la diète

Régression simple entre la calciémie et la phosphatémie sériques des rats n'ayant pas reçu de vitamine D. Chaque point représente un individu, dont le groupe est représenté par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) n=13, D-1,05:1 (●) n=9, D-2,1:1 (▲) n=14, D-3,5:1 (◆) n=13. La relation entre la calciémie et la phosphatémie peut être définie à l'aide de l'équation suivante : $P = 6.3 - 4.2 * Ca$ ($p > 0,0001$).

Figure 14



(D-1,1:1, D-1,05:1, D-2,1:1 et D-3,5:1). On observe une régression linéaire négative entre les concentrations de calcium et de phosphore sérique, R^2 -0,689 après 14 jours de traitement, avec un niveau de signification de $p < 0,0001$

3.8-RELATION ENTRE LA CALCÉMIE ET LES CONCENTRATIONS SÉRIQUES DE PARATHORMONE

La figure 15 montre la corrélation entre les concentrations sériques de calcium et de PTH au quatorzième jour du traitement pour les groupes ne recevant pas de vitamine D. Cette relation entre le calcium et la PTH est inversement proportionnelle; lorsque la calcémie augmente, les concentrations de PTH sérique diminuent, avec un R^2 de -0,449 ($p < 0,0001$).

3.9-RELATION ENTRE LA PHOSPHATÉMIE ET LE NIVEAU SÉRIQUE DE PARATHORMONE

La figure 16 montre la corrélation entre le phosphore et la parathormone pour les quatre groupes n'ayant pas reçu de vitamine D au cours du traitement. Dans cette relation, les deux variables augmentent de façon directement proportionnelle. Le R^2 est de 0,401 ($p < 0,0001$).

3.10-EXPRESSION GÉNIQUE DE CTGF

Tel qu'indiqué à la figure 17A, l'expression génique du CTGF est plus élevée chez le groupe D-1,1:1 (0,910) que chez le groupe D+1,1:1 (0,380 $p < 0,001$). Ce groupe montre aussi (fig. 17B), une expression significativement plus élevée que les groupes D-1,05:1 (0,434, $p < 0,001$) et D-3,5:1 (0,336, $p < 0,0001$). Il n'y a cependant pas de différence statistiquement significative avec le groupe D-2,3:1, qui montre

Figure 15

Corrélation entre la calcémie et la PTH sérique en fonction de la diète

Régression simple existant entre la calcémie et la parathormone sériques des animaux des groupes n'ayant pas reçu de vitamine D. Chaque point représente un animal et est représenté par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) n=13, D-1,05:1 (■) n=6, D-2,1:1 (▲) n=11, D-3,5:1 (○) n=12. La relation entre la calcémie et la PTH peut être définie à l'aide de l'équation suivante : $PTH = 1622 - 1077 \cdot Ca$ ($p > 0,0001$).

Figure 15

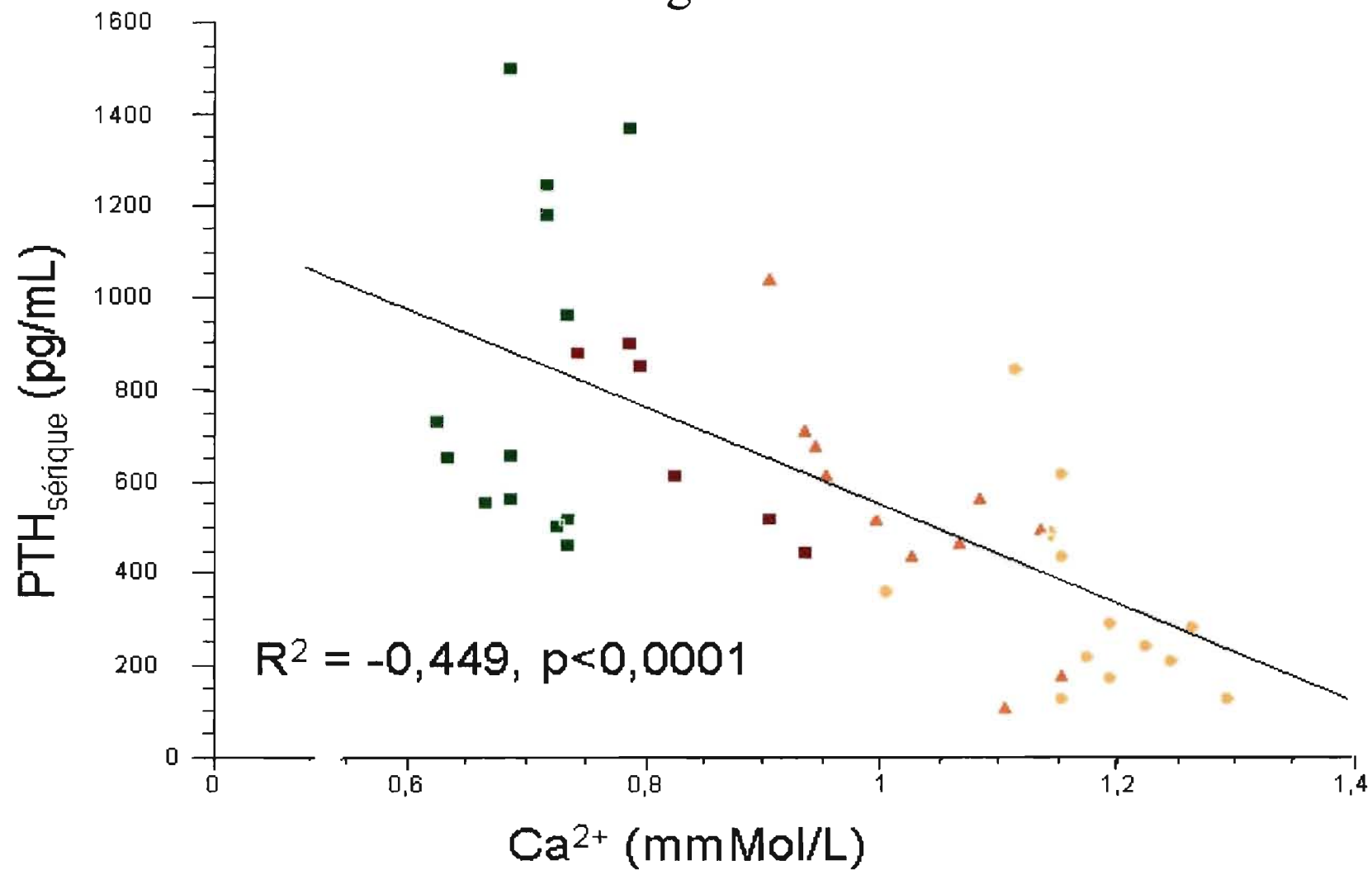


Figure 16

Corrélation entre la phosphatémie et la PTH sérique selon la diète

Régression simple entre la phosphatémie et la PTH sérique chez les animaux n'ayant pas reçu de vitamine D. Chaque point représente un animal et est représenté par les icônes suivantes : D-1,1:1 (■) n=9, D-1,05:1 (■) n=6, D-2,1:1 (▲) n=11, D-3,5:1 (○) n= 13. La relation entre la phosphatémie et la PTH peut être définie à l'aide de l'équation suivante : $PTH = 153 + 181 * P$ ($p > 0,0001$).

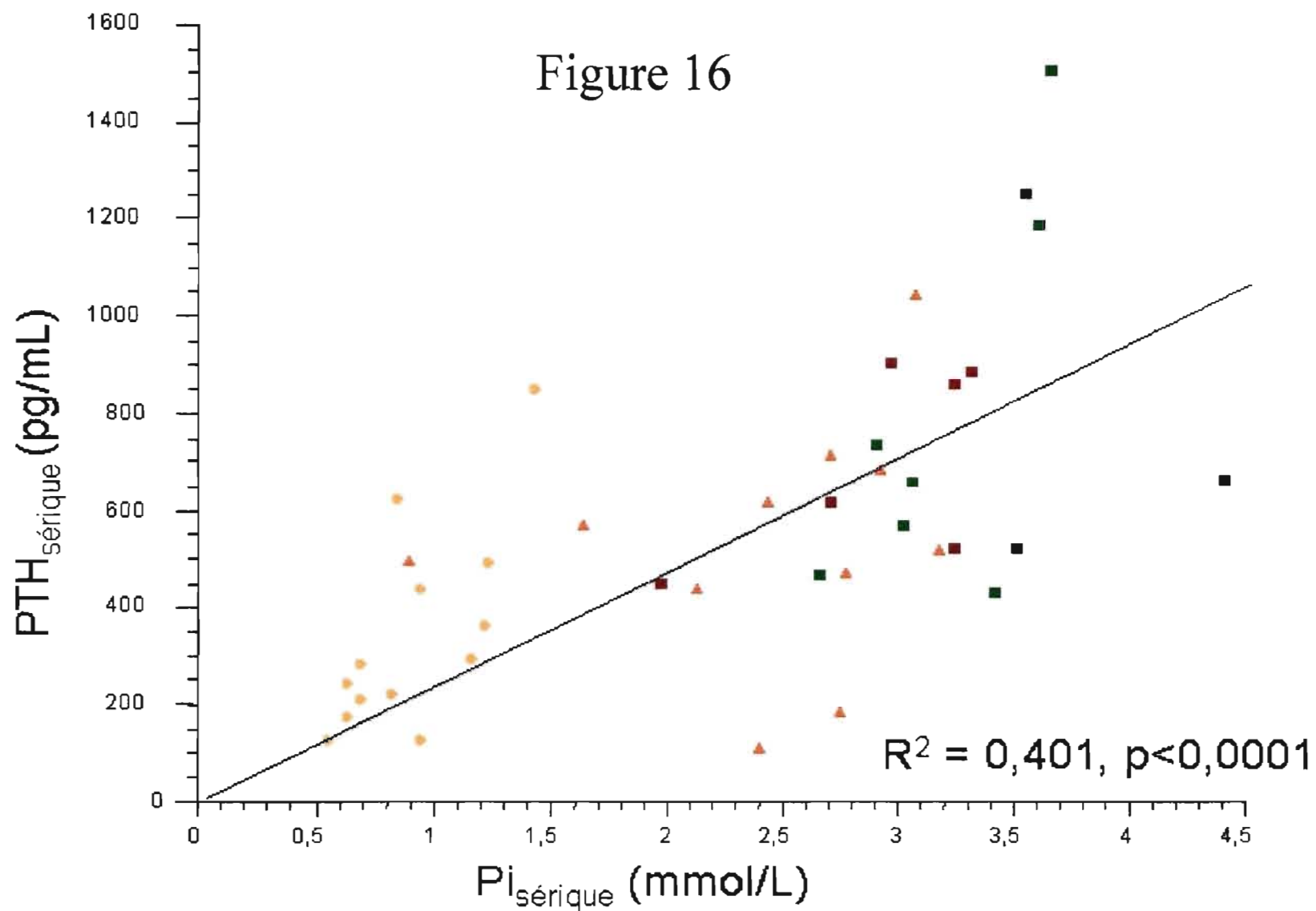


Figure 17

Expression génique du CTGF selon la diète

Le niveau de l'expression génique du *Connective Tissue Growth Factor* dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 17. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratios Ca : P alimentaire variable. B) Groupes d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 : 1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferroni/Dunn bilatéral.

Figure 17

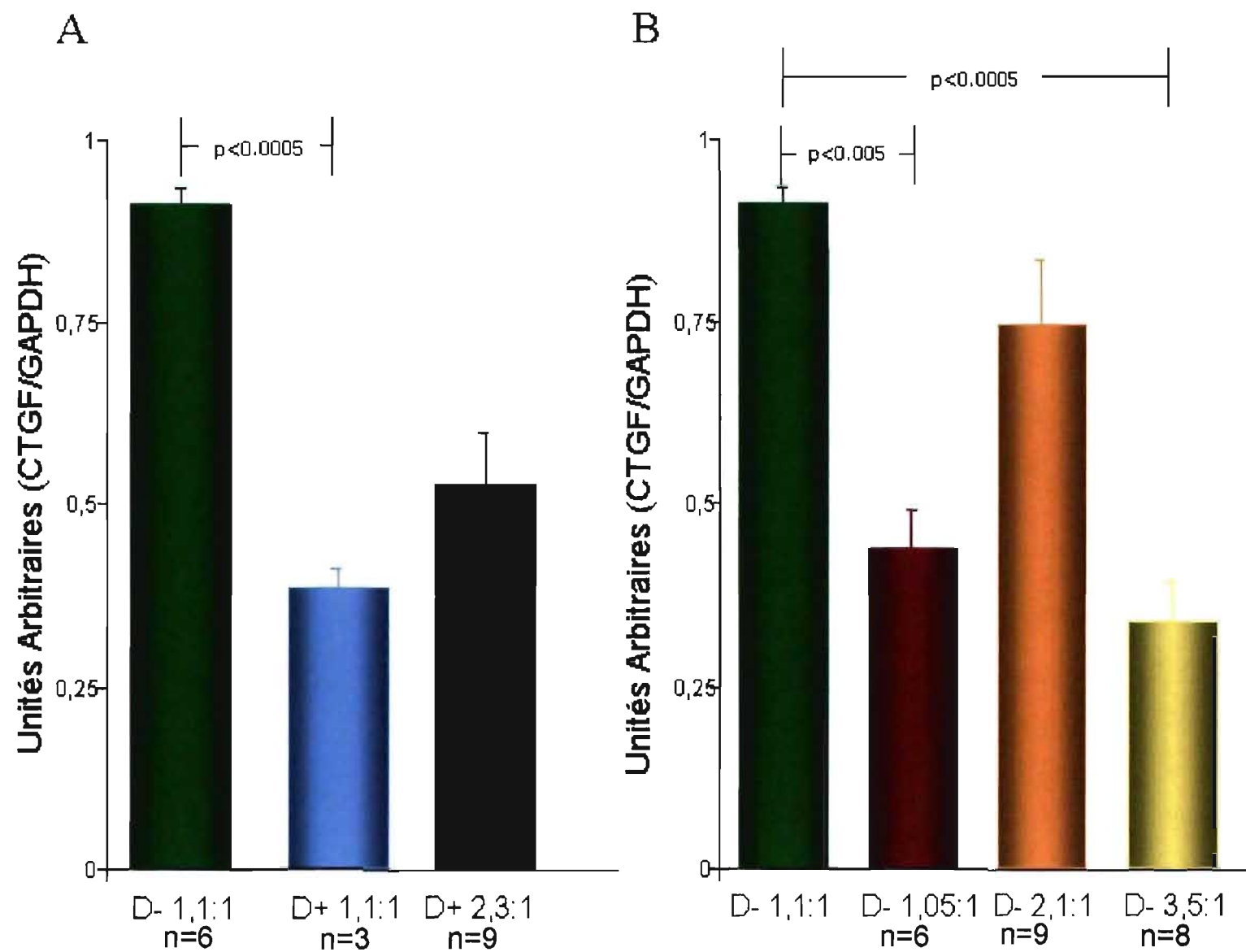
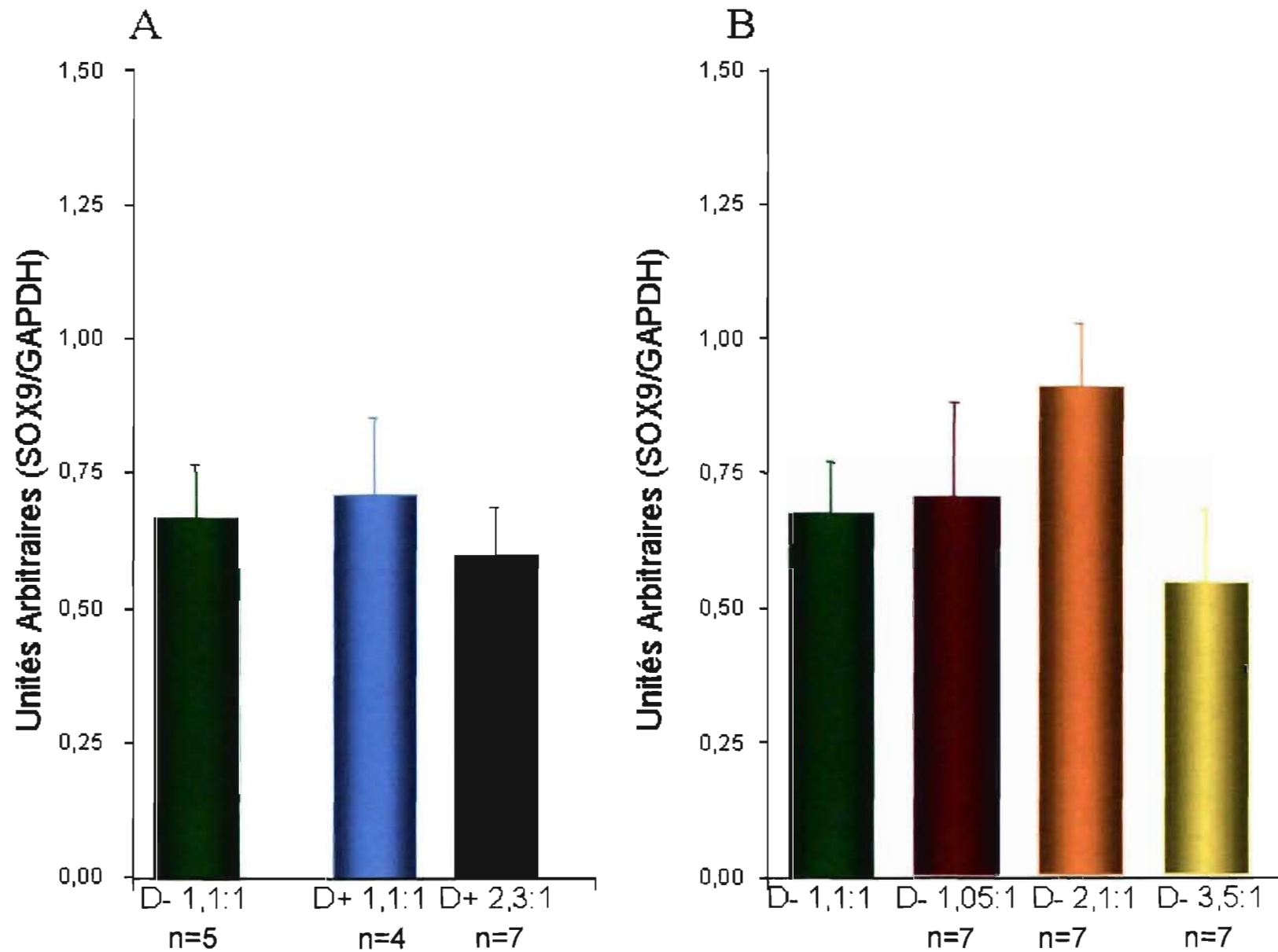


Figure 18

Expression génique de SOX-9 selon la diète

Le niveau de l'expression génique du gène *SOX-9* dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 18. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratios Ca : P alimentaire variable. B) Groupe d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 :1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral.

Figure 18



une expression plus élevée (0,741).

3.11-EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE SOX9

L'expression génique de SOX9 ne varie pas de façon significative entre les groupes tel que montré à la figure 18A et B.

3.12-EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE VEGF

L'expression génique du *Vascular Endothelial Growth Factor* est présentée à la figure 19. On constate que c'est le groupe D-1,1:1 qui se distingue des autres. L'expression de ce groupe est de 0,897 (en unité arbitraire, ratio du gène comparativement au GAPDH). Cette expression est significativement plus élevée que celles observées chez tous les autres groupes (D-1,05:1 (0,485, $p<0,01$), D-2,1:1 (0,527 $p<0,05$), D-3,5:1 (0,544 $p<0,05$) D+1,1:1 (0,397 $p<0,05$) et D+2,3:1 (0,469 $p<0,01$)). Aucun des autres groupes ne présente entre eux de différences significatives.

3.13-EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE VEGFR1 (FLT1)

L'expression génique du premier récepteur au VEGF a été évaluée chez tous les groupes expérimentaux. Tel qu'illustré dans la figure 20A et B, le groupe D-1,1:1 est le groupe qui exprime le plus fortement le gène VEGFR-1 (0,572). Cette valeur est statistiquement plus élevée que celle observée chez le groupe D+1,1:1 (Fig. 19A), $p<0,005$ et chez le groupe D-1,05:1 (Fig. 19B), $p<0,005$. Finalement, les groupes D+2,3:1, D-2,1:1 et D-3,5:1 (respectivement 0,438, 0,393 et 0,417) ont une expression du VEGFR-1 inférieure au groupe D-1,1 :1 mais cette différence est statistiquement non significative.

Figure 19

Expression génique de VEGF selon la diète

Le niveau de l'expression génique du *Vascular Endothelial Growth Factor* dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 19. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratios Ca : P alimentaire variable. B) Groupe d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 :1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test T de Bonferroni/Dunn bilatéral.

Figure 19

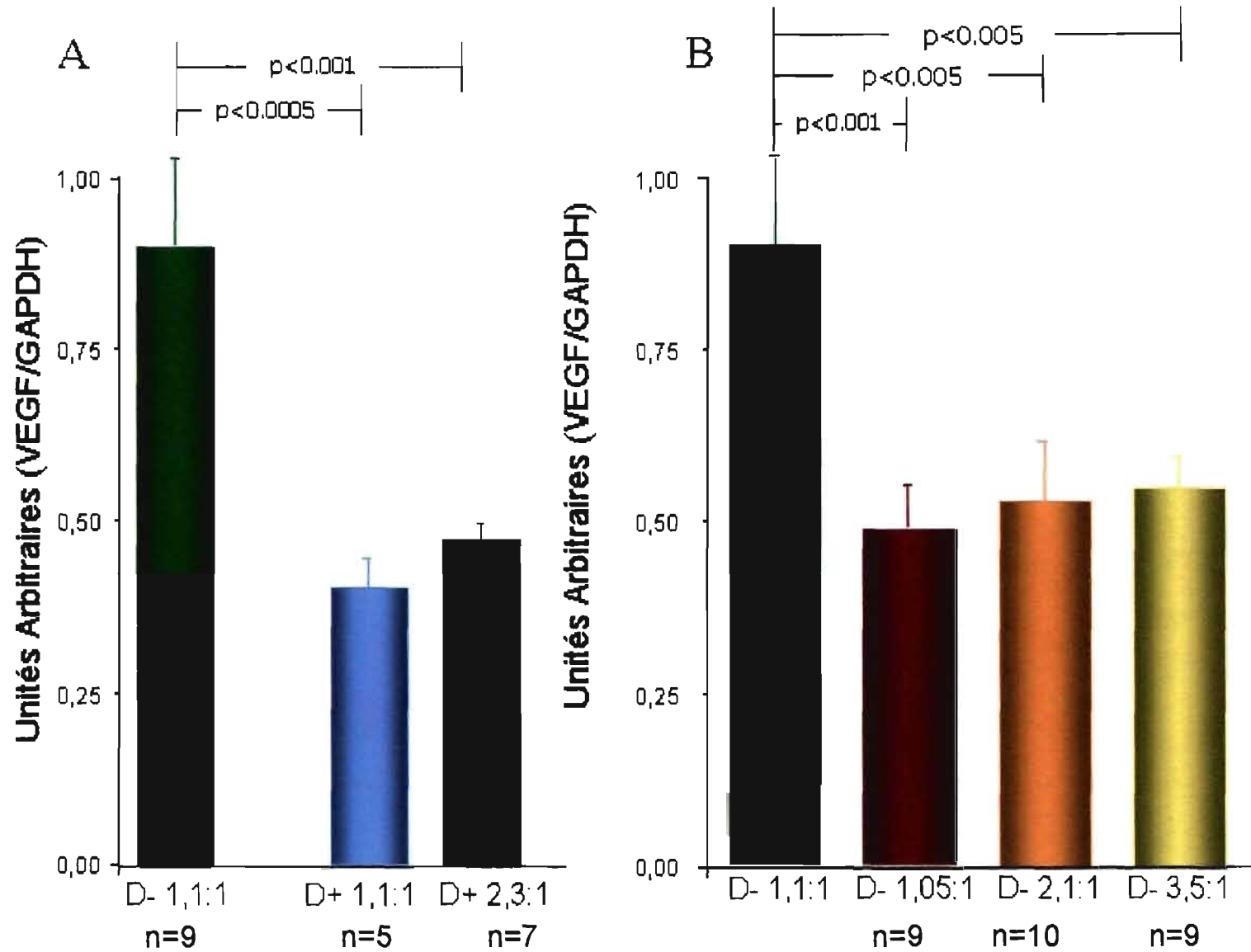
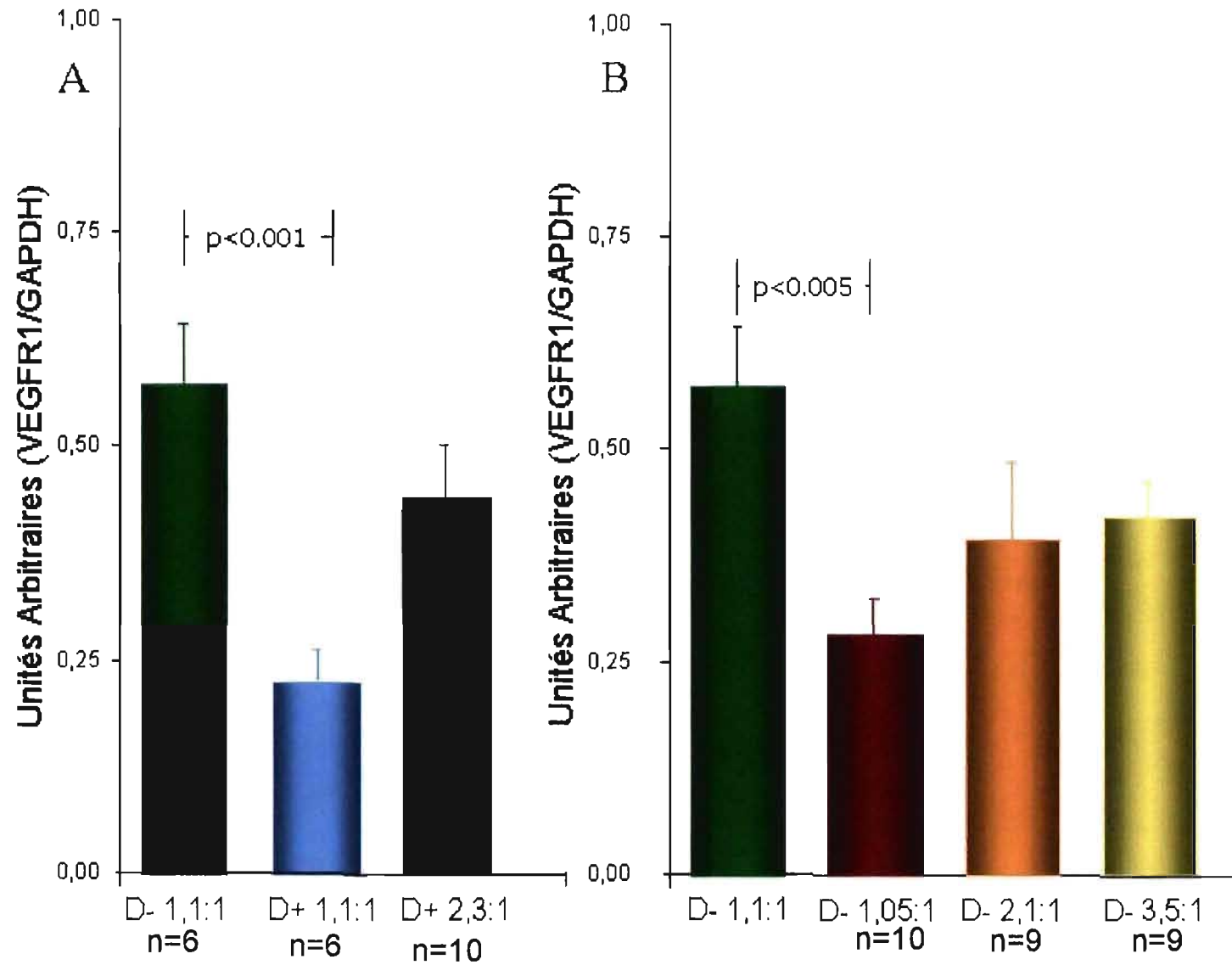


Figure 20

Expression génique de VEGFR1 selon la diète

Le niveau de l'expression génique du *VEGFR1* (*FLT-1*) dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 20. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratios Ca : P alimentaire variable. B) Groupe d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 :1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral.

Figure 20



3.14-EXPRESSION GÉNIQUE DE VEGFR2

L'expression génique du deuxième récepteur au VEGF qui est aussi connu comme FLK1 est présentée à la figure 21. Cette dernière ne montre aucune variation significative entre les cinq groupes qui ont été étudiés. Les résultats du groupe D+1,1:1 ne sont pas disponibles.

3.15-EXPRESSION GÉNIQUE DE MMP-9

L'expression génique de la *Matrix Metalloproteinase 9* est présentée à la figure 22. On observe une expression plus élevée de la MMP-9 chez le groupe D-1,1:1 que chez le groupe D+1,1:1 ($p<0,01$) mais non pas plus élevée que chez le groupe D+2,3:1 (figure 22A). Par ailleurs, chez les groupes carencés en vitamine D (figure 22B), on observe une diminution de l'expression de la MMP-9 par rapport au groupe D-1,1:1.

Figure 21

Expression génique du groupe VEGFR-2 selon la diète

Le niveau de l'expression génique du *VEGFR-2* dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 21. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratio Ca : P alimentaire variable. B) Groupe d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 :1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral.

Figure 21

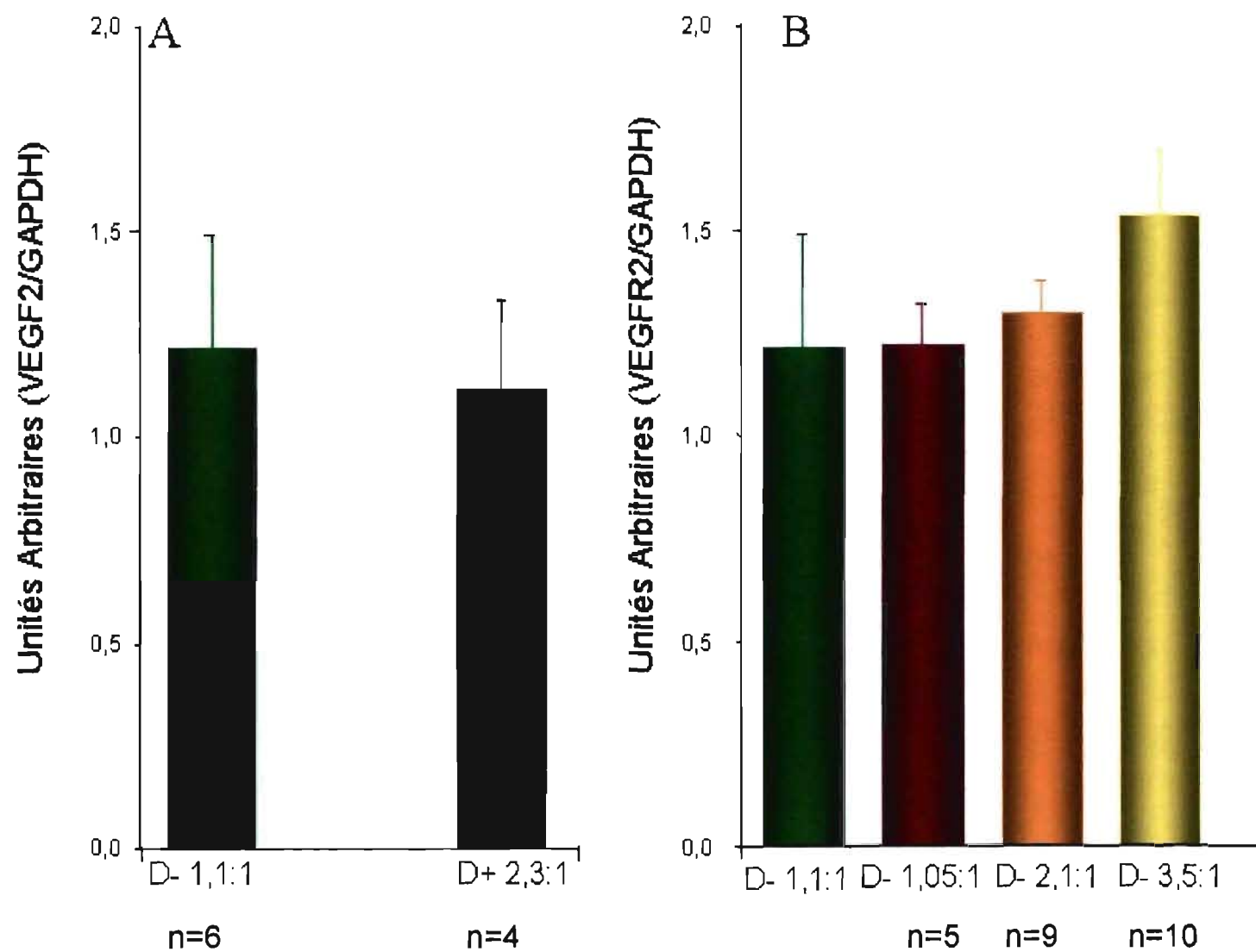
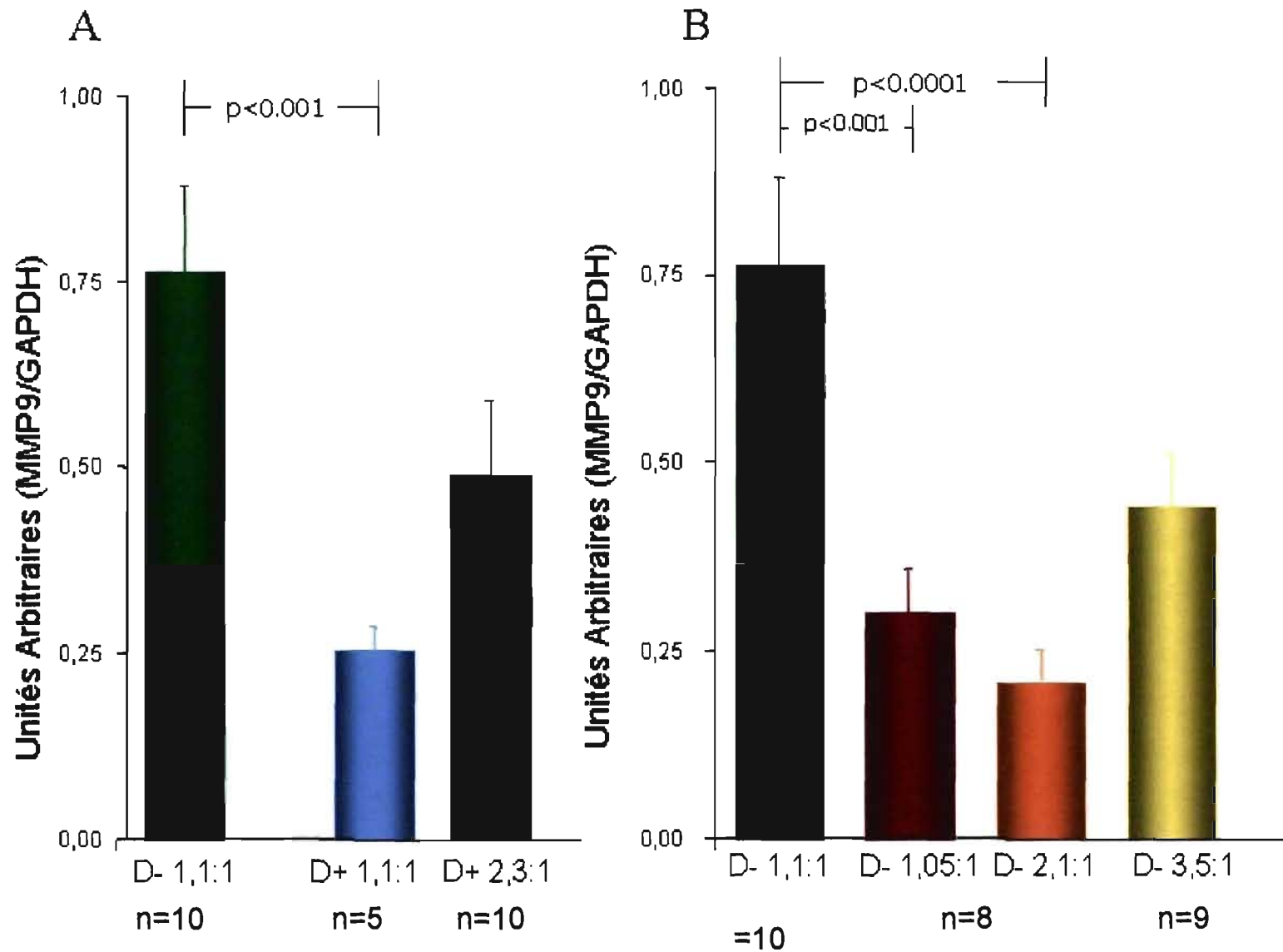


Figure 22

Expression génique de MMP9 selon la diète

Le niveau de l'expression génique du *Matrix Metalloproteinase 9* dans le cartilage de croissance des différents groupes au quatorzième jour du traitement est présenté à la figure 22. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type pour chacun des groupes. A) Groupes d'animaux ayant reçu une supplémentation en vitamine D présentant des ratios Ca : P alimentaire variable. B) Groupe d'animaux carencés en vitamine D présentant des ratios de Ca : P alimentaire variables. Le groupe D-1,1 :1 sert de groupe de référence pour chacun des sous-groupes. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été évaluées par ANOVA factorielle, alors que les comparaisons 2 à 2 ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn bilatéral.

Figure 22



CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'importance de l'hypovitaminose dans les sociétés occidentales et son impact sur la santé osseuse des personnes qui en souffrent nous obligent à améliorer notre compréhension des facteurs ayant une influence sur la croissance osseuse et sur le maintien en santé des os. Les résultats de nos travaux font progresser l'état des connaissances sur l'importance du ratio Ca : P dans l'apparition et la correction de pathologies associées à la carence en vitamine D.

Avant d'aborder le sujet des relations qui existent entre l'histologie osseuse et l'expression de gènes qui codent pour des protéines reliées à l'ossification endochondrale, revenons sur les effets du changement du ratio Ca: P sur certains paramètres physiologiques comme le poids des animaux et les concentrations circulantes de minéraux qui sont impliqués dans l'équilibre phosphocalcique.

Nos résultats montrent que même en absence d'un apport exogène en D, il est possible d'influencer le poids des animaux uniquement par des variations dans le ratio Ca:P de la diète. Il existe effectivement une variation significative du poids selon le groupe. En effet, les deux groupes qui ont un ratio calcium : phosphore bas et qui ne reçoivent pas de vitamine D montrent un poids plus faible que les autres groupes après 14 jours de traitement. Bien que cette croissance plus faible soit attendue pour le groupe D-1,1:1 qui reçoit un apport net faible en calcium et en phosphore, cette donnée est plus étonnante pour le groupe D-1,05:1, puisque ce groupe reçoit une quantité nette élevée des deux ions qui ne devrait pas être limitante pour leur croissance. Cette donnée concorde cependant avec l'hypothèse que le calcium et le phosphore seraient peu absorbés lorsque le ratio n'est pas équilibré.

Trois groupes arborent des calcémies normalisées; les deux qui reçoivent de la vitamine D ainsi que le groupe qui ne reçoit pas de vitamine D mais qui reçoit beaucoup de calcium mais peu de phosphore (D-3,5:1). Les deux groupes qui reçoivent autant de calcium que D-3,5:1 mais qui reçoivent des quantités plus élevées de phosphore (D-1,05:1 et D-2,1:1) n'atteignent pas la normocalcémie. La calcémie est donc hautement dépendante de l'apport en vitamine D mais, en absence de celle-ci, le ratio Ca:P alimentaire devient crucial afin de rétablir et de maintenir une normocalcémie sérique.

La phosphatémie du groupe D-3,5:1 est sous la normale. La quantité de phosphore présente dans l'alimentation ne semble pourtant pas être la limitante puisque le groupe D-1,1:1, qui est normophosphatémique, reçoit une quantité semblable de phosphore. Les animaux de ce groupe (D-3,5:1), qui reçoivent beaucoup de calcium et peu de phosphore, normalisent leur calcémie malgré l'absence de vitamine D. Cependant, s'ils reçoivent la même quantité des deux minéraux, (peu importe que cette quantité soit élevée (D-1,05:1) ou faible (D-1,1:1)) il est possible alors de normaliser la phosphatémie mais non la calcémie.

En absence de vitamine D, la difficulté d'absorption du calcium par rapport au phosphore doit donc être compensée par une plus grande disponibilité du calcium dans la diète. Néanmoins lorsque le ratio est élevé, comme chez le groupe D-3,5:1, l'absorption du phosphore semble compromise. Ceci peut-être expliqué par l'hypothèse de la chélation du calcium par le phosphore. Pour rétablir l'équilibre et permettre l'absorption des deux nutriments une juste proportion des deux éléments doit donc être atteinte dans la diète. Nos résultats semblent donc confirmer l'importance du maintien à l'équilibre du ratio Ca:P alimentaire.

Les animaux du groupe D-2,1:1 normalisent leur phosphatémie mais pas leur calcémie. Toutefois, il y a une augmentation significative de la calcémie entre le jour 0 et le quatorzième jour.

Les animaux du groupe D-1,05:1 exhibent une légère augmentation de la calcémie et demeurent normophosphatémique. Les ratios Ca:P de ces deux groupes semblent donc appropriés afin de ne pas entraver complètement l'absorption de ces minéraux. Néanmoins, notre objectif était d'identifier une diète permettant d'atteindre une normalisation des concentrations sériques de Ca^{2+} . Ainsi, une diète dont le ratio Ca:P se situe à 2,30:1 permet de se rapprocher de cet objectif et ce, sans compromettre la normophosphatémie.

La figure 14 illustre bien la relation entre la calcémie et la phosphatémie pour les animaux des groupes qui ne reçoivent pas de vitamine D. Il s'établit une relation inverse entre les concentrations de phosphore et le calcium sérique ($P = 6.3 - 4.2 * Ca$). Cette relation confirme l'hypothèse de la liaison du calcium sérique par le phosphore inorganique.

Comme il est indiqué à la figure 11 montrant les différences de concentrations sériques de PTH après quatorze jours de traitement, deux groupes se distinguent des autres, et ce sont ceux qui ont reçu une supplémentation en vitamine D. La présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ semble déterminante pour abaisser le taux de PTH (132). Les figures 15 et 16 montrent quant à elles qu'en absence de vitamine D, la normalisation de la calcémie et de la phosphatémie semblent presque aussi efficace l'une que l'autre pour diminuer la concentration de parathormone dans le sang. La figure 15 montre clairement une relation entre le calcium et la concentration de PTH circulante qui est inversement proportionnelle ($\text{PTH} = 1622 - 1077 * Ca$). La figure 16 montre que les

concentrations de phosphore sont également corrélées négativement avec la concentration de PTH ($PTH = 153 + 181 \cdot P$).

Une des données étonnantes de notre étude est illustrée à la figure 12, où sont indiquées les concentrations sériques de $1,25(OH)_2 D_3$ des groupes ayant reçu 6,5nM/jour de vitamine D_3 (D+1,1:1 et D+2,3:1) et du groupe témoin D-1,1:1 (qui n'en a pas reçu). Bien que le processus de supplémentation produit dans les deux groupes une augmentation des concentrations sériques de $1,25(OH)_2 D_3$, le maximum atteint chez le groupe D+1,1:1 est presque deux fois plus élevé que celui du groupe qui a un ratio Ca:P normal. Cette différence entre les deux groupes dans les concentrations sérique de $1,25(OH)_2 D_3$ perdure au septième jour et s'accroît au quatorzième jour. Ces groupes reçoivent pourtant la même quantité de phosphore et de vitamine D mais l'apport en calcium de la diète des animaux D+1,1:1 est deux fois moins important que celui du groupe D+2,3:1.

L'augmentation chez le groupe D+1,1:1 de la concentration sérique de $1,25(OH)_2 D_3$ permet à ces animaux d'absorber plus efficacement le calcium et le phosphore de la diète malgré les faibles quantités, et d'en réabsorber le maximum par le rein. Ces animaux sont normocalcémiques et normophosphatémiques. Cependant, il est possible que la quantité de calcium et de phosphore dans la diète ne permette pas de combler les besoins malgré la grande récupération induite par la $1,25(OH)_2 D_3$. Habituellement, dans ces conditions, l'os sera résorbé pour permettre de maintenir les concentrations sériques.

Histologiquement on observe que l'os cortical du groupe D+1,1:1 est aminci comparativement à celui des animaux sains alors que cet effet n'est pas perceptible au niveau de l'os trabéculaire, pas plus que du côté du cartilage de croissance. Ceci représente le principal indice de la carence; ces animaux manifestent un rétablissement

partiel de l'état de carence dans lequel ils se trouvent en début de traitement sans exhiber une histologie pathologique. On observe également que la minéralisation semble être en cours de normalisation. Les processus de prolifération et de la maturation indiquent une amélioration qui laisse supposer que le maintien de ce régime évoluerait vers un rétablissement complet du cartilage. L'apport en vitamine D avec des quantités faibles de calcium et de phosphore dans l'alimentation met en péril la santé de l'os cortical, alors que la croissance osseuse, ainsi que le cartilage semblent en voie de rétablissement. C'est pour éviter ce problème que la supplémentation en vitamine D devrait toujours être accompagnée d'une quantité suffisante de calcium. La longue expérience clinique de supplémentation en vitamine D montre en effet que des effets secondaires indésirables peuvent survenir lorsque la supplémentation en vitamine D n'est pas accompagnée par un apport suffisant en calcium.

Chez les animaux de ce groupe, la concentration de PTH est basse. En 2003, Ueno *et al.* (41) suggéraient que *in vivo* la résorption nécessitait l'effet coordonné de la PTH et de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, et que lorsque la PTH était absente, seules des concentrations pharmacologiques de calcitriol pouvaient induire une augmentation de la résorption. Les observations faites chez les animaux du groupe D+1,1:1 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ élevé, PTH faible, calcémie normale malgré un faible apport alimentaire) semble contredire cette donnée. St-Arnaud *et al.* (142) rapportent dans un article sur l'inactivation du gène de la D_3 -24-hydroxylase chez des souris qui ont, par conséquent des concentrations sériques élevées de calcitriol, un problème aux sites d'ossifications intramembranaires. Ce problème se répercute dans l'os cortical fémoral qui montre une diminution de son épaisseur puisque le périoste est un site d'ossification endomembranaire pour la croissance transversale. Ils présument que cet effet est dû à l'augmentation physiologique des quantités de calcitriol sériques puisque

le gène qui code pour l'enzyme responsable du catabolisme de la molécule est inopérant. Nous pouvons dès lors supposer que l'augmentation de la concentration de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sans PTH (comme c'est le cas pour les animaux de l'équipe de St-Arnaud *et al.* (142) et du groupe D+1,1:1) agit spécifiquement aux sites d'ossifications intramembranaires, sans effets notables sur l'ossification endochondrale.

Des études (143) ont également démontré qu'une minéralisation normale dépend surtout de la normalisation sérique des concentrations de calcium et de phosphore. Chez nos animaux supplémentés en D mais faiblement en Ca et en P, il semble bien que le maintien des concentrations sériques de ces minéraux demande une résorption sur un autre site osseux.

L'observation de l'histologie osseuse des animaux des groupes D-1,1:1 et D-1,05:1 indique une ostéomalacie et ces deux groupes exhibent une phosphatémie normale, une hypocalcémie et un niveau élevé de PTH sérique. Puisque l'ostéomalacie est une manifestation d'un défaut de minéralisation, il peut être supposé que dans ces deux cas la quantité de calcium nécessaire à la minéralisation n'a pas été atteinte. Le groupe D-3,5:1 est rachitique et montre une normocalcémie mais une hypophosphatémie. Ce phénotype observé concorde parfaitement avec la théorie qui indique que le rachitisme est une conséquence d'une diminution de l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, et que le phosphore est obligatoire dans le processus d'apoptose en raison de son implication dans la voie d'activation de la caspase 9 (86).

En ce qui concerne l'expression génique des différentes cellules du cartilage de croissance, notre objectif était de vérifier si le phénotype observé du cartilage de croissance des divers groupes d'animaux était en relation avec l'expression de gènes qui codaient pour des protéines importantes dans le processus de maturation et vascularisation du cartilage. À partir des travaux de Mailhot *et al.* (132), nous avons

émis l'hypothèse que l'expression de ces différents gènes serait tributaire du nombre et du stade de maturation de certaines populations cellulaires qui composent le cartilage dont particulièrement les chondrocytes, par l'effet du régime alimentaire ces cellules (e.g.; leur différenciation, multiplication et apoptose).

Nous avons d'abord vérifié l'expression d'un gène qui code pour une protéine représentative du processus de maturation des chondrocytes, SOX9, qui est exprimée au début de la maturation et qui est essentielle à la différenciation des cellules souches jusqu'au stade de prolifération. Aucune différence significative d'expression génique de SOX9, n'est observée entre les groupes d'animaux étudiés. Sans être attendu, ce résultat est en accord avec l'histologie observée, puisqu'aucun des phénotypes ne montrent de perturbations importantes du développement cellulaire au début du processus de maturation du cartilage.

Le second gène que nous avons mesuré code également pour une protéine active dans le processus de maturation de l'ossification endochondrale. Le CTGF régule la fin du processus de maturation jusqu'à l'entrée des chondrocytes en hypertrophie. Comme nous l'avons mentionné dans la section précédente, les groupes qui expriment le plus le CTGF sont les groupes D-1,1:1 et D-2,1:1. Si nous faisons un rappel des caractéristiques de chacun de ces groupes, nous pouvons dire que les animaux des groupes D-1,1:1 souffrent d'ostéomalacie, d'hypocalcémie d'hyperphosphatémie et d'hyperparathyroïdie secondaire, alors que les animaux du groupe D-2,1:1 sont également hypocalcémiques et en hyperparathyroïdie quoique moins sévèrement que les animaux du groupe précédent. Toutefois ces animaux montrent une correction de leur ostéomalacie et de leur hyperphosphatémie. Un autre groupe présente un portrait biochimique et histologique semblable aux animaux du groupe D-1,1:1; il s'agit des animaux D-1,05:1 (pour la calcémie, la PTH et

l'ostéomalacie) qui exhibent une expression du gène CTGF qui est significativement plus basse que les animaux du groupe D-1,1:1. Il apparaît donc que l'expression génique n'est pas directement corrélée avec le phénotype ou avec le profil biochimique des animaux qui ont été analysés dans cette étude.

Nous avons posé l'hypothèse que l'expression du gène qui code pour *CTGF* chez les animaux du groupe D-3,5:1 serait plus élevée puisque le rachitisme dont ces animaux souffrent entraîne un élargissement du cartilage de croissance en raison d'une mort cellulaire plus faible des chondrocytes qui restent au stade hypertrophique plus longtemps (85). De manière étonnante, nous observons une expression plus basse chez les animaux de ce groupe. Le profil histologique montre bien que la plaque de croissance de ces animaux est beaucoup plus large et que cet élargissement est provoqué par une augmentation du nombre des chondrocytes hypertrophiques; le profil désorganisé de ces chondrocytes semble toutefois suggérer que, dans ces conditions, l'expression pourrait être différente du processus normal de maturation des chondrocytes. Le CTGF sécrété par les chondrocytes hypertrophiques provoque la prolifération et la différenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques (144). Il se peut que les cellules déséquilibrées du cartilage rachitique cessent d'exprimer le CTGF pour ne plus induire l'épaississement du cartilage.

L'expression de gènes qui codent pour des protéines importantes du processus de la vascularisation du cartilage indique un profil d'expression similaire qui se répète d'un gène à l'autre à l'exception de l'expression du second récepteur de VEGF, (VEGFR2) qui ne présente pas de variations significatives d'un groupe à l'autre et ce, pour l'ensemble des groupes étudiés. Pour l'expression des autres gènes (*MMP9*, *VEGF* et *VEGFR1*) nous avons observé que le groupe D-1,1:1 se démarque par son expression plus élevée pour les trois gènes. À l'opposé, l'expression chez le groupe

D+1,1:1 est faible pour ces trois gènes. Tout comme dans le cas des gènes de la maturation, l'expression des gènes qui codent pour des protéines de la vascularisation ne semble pas directement lié au phénotype. Mais la présence d'un même schéma d'expression pour certains groupes suggère que celui-ci peut être associé à certaines caractéristiques biochimiques. Les animaux du groupe D-1,1:1 sont les seuls qui exhibent une hyperphosphatémie et une hypocalcémie sévères. La surexpression des gènes de la vascularisation pourrait donc être une conséquence de ces dérèglements biochimiques. Le groupe D+1,1:1 dont l'expression est basse pour l'ensemble des gènes de la vascularisation montre un profil histologique de la plaque de croissance qui tend vers la normalité. Le groupe dont le ratio Ca :P est équilibré et qui est carencé en vitamine D (D-2,1:1) ne montre pas de différence significative comparativement au groupe « normal » (D+2,3:1) quant aux expressions de VEGF et VEGFR1 mais elle est significativement plus basse pour MMP9, ce qui pourrait signifier un ralentissement dans le processus de la vascularisation du cartilage chez les animaux carencés.

CHAPITRE 5:

CONCLUSION

La première partie de cette étude fut consacrée à l'étude de l'effet sur la santé osseuse de diètes dont le contenu en minéraux (Ca et P) et en vitamine D étaient variables dans un modèle animal de rats carencés en calcium et en vitamine D.

Ce modèle de carence nutritionnelle chez le rat est particulièrement intéressant puisqu'il permet, contrairement à ce qui est observé chez l'humain, de discriminer l'ostéomalacie du rachitisme chez l'animal jeune par simple modification de la diète. Il est ainsi possible de voir que les deux pathologies ont des causes et des mécanismes différents. Chez l'humain, ces différences sont peu apparentes puisque l'un des phénotypes (le rachitisme) prédomine sur l'autre.

Nos résultats confirment l'importance d'un équilibre dans l'apport en calcium et en phosphore dans la diète et tout particulièrement en absence de vitamine D. Cet équilibre peut faire la différence entre une normalisation de l'histologie osseuse et l'apparition et le développement d'une pathologie. La présence de calcitriol permet de court-circuiter le ratio Ca :P puisque l'augmentation de l'absorption du calcium et du phosphore permet de normaliser les concentrations sériques de ces minéraux. Cette normalisation des concentrations sériques régule de façon directe et indirecte (via la PTH) les concentrations circulantes du métabolisme actif de la vitamine D, le calcitriol.

Bien que le ratio Ca :P ait le même effet sur la chélation du calcium intestinal par le phosphore en présence de vitamine D, l'augmentation du transport actif du calcium par la vitamine D permet de mieux absorber le calcium. Dans certains cas, cependant, lorsque la quantité de minéraux est trop faible, l'effet de la vitamine D sur

l'absorption ne suffit plus pour normaliser les concentrations circulantes. Dans ces cas, la concentration de calcitriol sanguine demeure alors élevée. Il semble évident que des concentrations physiologiques élevées de calcitriol de façon chronique puissent affecter l'os, puisque l'os cortical des animaux du groupe D+1,1:1 est particulièrement fragilisé. Le mécanisme à l'origine de ce phénomène reste inconnu. Habituellement, comme nous l'avons mentionné, la PTH est indispensable au processus de résorption de l'os. Des travaux supplémentaires avec des animaux supplémentés en D mais soumis à une diète basse en calcium et en phosphore seraient nécessaires afin de comprendre de quelle manière la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit sur l'os cortical.

Une autre question soulevée par cette observation est la présence de mécanismes d'action différents entre l'os cortical et l'os trabéculaire formé à partir du cartilage de croissance, ou encore entre l'ossification intra-membranaire et endochondrale. Certaines cellules, comme les ostéoblastes ou les ostéoclastes, semblent montrer une spécialisation selon leur localisation dans l'os puisque certains stimuli montrent un effet préférentiel sur l'os trabéculaire ou l'os cortical. Les hormones thyroïdiennes sont, par exemple, responsables d'une résorption osseuse au niveau cortical (80). Ce qui cause cette spécialisation cellulaire n'est pas encore connu.

La relation entre les concentrations de calcium et de phosphore a permis de montrer qu'un ratio Ca :P d'environ 2 :1 permet de maximiser l'absorption de ces deux éléments. Les animaux utilisés dans cette étude qui reçoivent un tel ratio ne réussissent cependant pas à normaliser leur concentration sérique de calcium. Il semble que l'augmentation de la quantité nette de minéraux que ces animaux ingèrent sans en modifier le ratio permettrait d'atteindre la normocalcémie. Si cette donnée était vérifiée, il serait intéressant de voir la santé osseuse de ces animaux.

L'effet de l'absence de vitamine D chez des animaux de type sauvage dont les concentrations sériques de calcium et de phosphore sont normales serait intéressant, puisqu'il permettrait de comprendre l'effet du calcitriol sur le système osseux à l'extérieur de l'homéostasie phosphocalcique. Jusqu'à maintenant, cet effet n'a été démontré que par l'intermédiaire d'animaux dont certains gènes avait été désactivés, mais n'as pas été démontré par des carences nutritionnelles.

Si l'expression génique du cartilage de croissance ne semble pas liée à l'histologie ou au statut biochimique, néanmoins, l'observation faite auprès des animaux issus du groupe D-1,1:1 qui montrent une expression plus importante de presque tous les gènes étudiés, indique que la carence alimentaire chronique en calcium et en vitamine D perturbe, de manière importante, l'expression de gènes qui codent pour des protéines responsables de la maturation et de la vascularisation de l'ossification endochondrale.

CHAPITRE 6 :

RÉFÉRENCES

- 1) **DeLuca,H.F.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D, *Am.J.Clin.Nutr.*, **80** : 1689S-1696S (2004)
- 2) **Omdahl,J.L., Morris,H.A., May,B.K.** Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation, *Annu.Rev.Nutr.*, **22** : 139-166 (2002)
- 3) **Holick,M.F.** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health, *Mayo Clin.Proc.*, **81** : 353-373 (2006)
- 4) **Webb,A.R.** Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis, *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, **92** : 17-25 (2006)
- 5) **Holick,M.F.** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, *Am.J.Clin.Nutr.*, **80** : 1678S-1688S (2004)
- 6) **Holick,M.F.** Vitamin D: A millenium perspective, *J.Cell Biochem.*, **88** : 296-307 (2003)
- 7) **Calvo,M.S., Whiting,S.J., Barton,C.N.** Vitamin D intake: a global perspective of current status, *J.Nutr.*, **135** : 310-316 (2005)
- 8) **Calvo,M.S., Whiting,S.J.** Overview of the proceedings from Experimental Biology 2004 symposium: vitamin D insufficiency: a significant risk factor in chronic diseases and potential disease-specific biomarkers of vitamin D sufficiency, *J.Nutr.*, **135** : 301-303 (2005)
- 9) **Hanley,D.A., Davison,K.S.** Vitamin D insufficiency in North America, *J.Nutr.*, **135** : 332-337 (2005)
- 10) **Hollis,B.W.** Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D, *J.Nutr.*, **135** : 317-322 (2005)
- 11) **Houghton,L.A., Vieth,R.** The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement, *Am.J.Clin.Nutr.*, **84** : 694-697 (2006)
- 12) **Speeckaert,M., Huang,G., Delanghe,J.R., Taes,Y.E.** Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism, *Clin.Chim.Acta*, **372** : 33-42 (2006)

- 13) **Nussey S.S., Whitehead S.A.**, The parathyroid glands and vitamin D. In : *Endocrinology; An integrated approach*, Bios Scientific Publisher, (2001)
- 14) **Aurbach G.D., Marx S.J., Spiegel A.M.**, Parathyroid Hormone, Calcitonin, and the calciférol. In : *Williams Textbook of Endocrinology*, Wilson J.D. and Foster D.W., W.B. Saunders Compagny, 1397-1517 (1992)
- 15) **Ohyama,Y., Yamasaki,T.** Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism, *Front Biosci.*, **9** : 3007-3018 (2004)
- 16) **Prosser,D.E., Jones,G.** Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D, *Trends Biochem.Sci.*, **29** : 664-673 (2004)
- 17) **Cheng,J.B., Motola,D.L., Mangelsdorf,D.J., Russell,D.W.** De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase, *J.Biol.Chem.*, **278** : 38084-38093 (2003)
- 18) **Cheng,J.B., Levine,M.A., Bell,N.H., Mangelsdorf,D.J., Russell,D.W.** Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, **101** : 7711-7715 (2004)
- 19) **St-Arnaud,R., Messerlian,S., Moir,J.M., Omdahl,J.L., Glorieux,F.H.** The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus, *J Bone Miner.Res.*, **12** : 1552-1559 (1997)
- 20) **Bland,R., Zehnder,D., Hewison,M.** Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase along the nephron: new insights into renal vitamin D metabolism, *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, **9** : 17-22 (2000)
- 21) **Dusso,A.S., Brown,A.J., Slatopolsky,E.** Vitamin D, *Am.J.Physiol Renal Physiol*, **289** : F8-28 (2005)
- 22) **Hewison,M., Zehnder,D., Bland,R., Stewart,P.M.** 1alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D, *Journal of Molecular Endocrinology*, **25** : 141-148 (2000)
- 23) **Bland,R., Walker,E.A., Hughes,S.V., Stewart,P.M., Hewison,M.** Constitutive Expression of 25-Hydroxyvitamin D3-1{alpha}-Hydroxylase in a Transformed Human Proximal Tubule Cell Line: Evidence for Direct Regulation of Vitamin D Metabolism by Calcium, *Endocrinology*, **140** : 2027-2034 (1999)
- 24) **Murayama,A., Takeyama,K., Kitanaka,S., Kodera,Y., Kawaguchi,Y., Hosoya,T., Kato,S.** Positive and Negative Regulations of the Renal 25-Hydroxyvitamin D3 1{alpha}-Hydroxylase Gene by Parathyroid Hormone, Calcitonin, and

- 1{alpha},25(OH)2D3 in Intact Animals, *Endocrinology*, **140** : 2224-2231 (1999)
- 25) Shimada,T., Hasegawa,H., Yamazaki,Y., Muto,T., Hino,R., Takeuchi,Y., Fujita,T., Nakahara,K., Fukumoto,S., Yamashita,T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis, *J.Bone Miner.Res.*, **19** : 429-435 (2004)
 - 26) Jones,G., Tenenhouse,H.S. 1,25(OH)2D, the preferred substrate for CYP24, *J.Bone Miner.Res.*, **17** : 179-181 (2002)
 - 27) Christakos,S., Dhawan,P., Liu,Y., Peng,X., Porta,A. New insights into the mechanisms of vitamin D action, *J.Cell Biochem.*, **88** : 695-705 (2003)
 - 28) Zierold,C., Mings,J.A., DeLuca,H.F. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone, *J.Cell Biochem.*, **88** : 234-237 (2003)
 - 29) Iwata,K., Yamamoto,A., Satoh,S., Ohyama,Y., Tashiro,Y., Setoguchi,T. Quantitative immunoelectron microscopic analysis of the localization and induction of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase in rat kidney, *J.Histochem.Cytochem.*, **43** : 255-262 (1995)
 - 30) wasserman R.H., Vitamin D and the intestinal absorption of calcium: A view and overview. In : *Vitamin D*, feldman, pike, and Glorieux, F. H., 411-428 (2005)
 - 31) Tenenhouse,A., Portale,A.A., Phosphate Homeostasis. In : *Vitamin D*, Feldman, D, Pike, J. W., and Glorieux, F. H., Elsevier, 453-475 (2005)
 - 32) Tebben P, Kumar,R., Vitamin D and the kidney. In : *Vitamin D*, feldman, pike, and Glorieux, F. H., Elsevier, 515-536 (2005)
 - 33) Hoenderop,J.G., Dardenne,O., Van,A.M., Van Der Kemp,A.W., Van Os,C.H., Arnaud,R., Bindels,R.J. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice, *FASEB J*, **16** : 1398-1406 (2002)
 - 34) Dardenne,O., Prud'homme,J., Hacking,S.A., Glorieux,F.H., St-Arnaud,R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1[alpha]-hydroxylase (CYP27B1), *Bone*, **32** : 332-340 (2003)
 - 35) Stern P.H, Bone. In : *Vitamin D*, feldman, pike, and Glorieux, F. H., Elsevier, 565-573 (2005)

- 36) **van,D.M., Pols,H.A., van Leeuwen,J.P.** Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites, *Curr.Pharm.Des.*, **10** : 2535-2555 (2004)
- 37) **Suda,T., Ueno,Y., Fujii,K., Shinki,T.** Vitamin D and bone, *J.Cell Biochem.*, **88** : 259-266 (2003)
- 38) **Marie P.** Différenciation, fonction et controle de l'ostéoblaste, *Médecine Science*, **12** : 1252-1259 (2001)
- 39) **Yoshizawa,T., Handa,Y., Uematsu,Y., Takeda,S., Sekine,K., Yoshihara,Y., Kawakami,T., Arioka,K., Sato,H., Uchiyama,Y., Masushige,S., Fukamizu,A., Matsumoto,T., Kato,S.** Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning, *Nat Genet.*, **16** : 391-396 (1997)
- 40) **Takeda,S., Yoshizawa,T., Nagai,Y., Yamato,H., Fukumoto,S., Sekine,K., Kato,S., Matsumoto,T., Fujita,T.** Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice, *Endocrinology*, **140** : 1005-1008 (1999)
- 41) **Ueno,Y., Shinki,T., Nagai,Y., Murayama,H., Fujii,K., Suda,T.** In vivo administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses the expression of RANKL mRNA in bone of thyroparathyroidectomized rats constantly infused with PTH, *J Cell Biochem.*, **90** : 267-277 (2003)
- 42) **Kostenuik,P.J.** Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength, *Current Opinion in Pharmacology*, **5** : 618-625 (2005)
- 43) **Hendy,G.N., Goltzman,D.** Does calcitriol have actions independent from the vitamin D receptor in maintaining skeletal and mineral homeostasis?, *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, **14** : 350-354 (2005)
- 44) **Pedrozo,H.A., Boyan,B.D., Mazock,J., Dean,D.D., Gomez,R., Schwartz,Z.** TGFbeta1 regulates 25-hydroxyvitamin D3 1alpha- and 24-hydroxylase activity in cultured growth plate chondrocytes in a maturation-dependent manner, *Calcif.Tissue Int.*, **64** : 50-56 (1999)
- 45) **Lin,R., Amizuka,N., Sasaki,T., Aarts,M.M., Ozawa,H., Goltzman,D., Henderson,J.E., White,J.H.** 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9, *J.Bone Miner.Res.*, **17** : 1604-1612 (2002)
- 46) **Boyan,B.D., Schwartz,Z.,** Cartilage and Vitamin D: Genomic and nongenomic regulation by 1,25(OH)2D3 and 24,25(OH)2D3. In :

Vitamin D, Feldman, D, Pike, J. W., and Glorieux, F. H., Elsevier, 575-599 (2005)

- 47) **Wu,L.N., Genge,B.R., Ishikawa,Y., Ishikawa,T., Wuthier,R.E.** Effects of 24R,25- and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on mineralizing growth plate chondrocytes, *J Cell Biochem.*, **98** : 309-334 (2006)
- 48) **Schwartz,Z., Gilley,R.M., Sylvia,V.L., Dean,D.D., Boyan,B.D.** Prostaglandins mediate the effects of 1,25-(OH) $_2$ D3 and 24,25-(OH) $_2$ D3 on growth plate chondrocytes in a metabolite-specific and cell maturation-dependent manner, *Bone*, **24** : 475-484 (1999)
- 49) **Jones,G., Strugnell,S.A., DeLuca,H.F.** Current understanding of the molecular actions of vitamin D, *Physiol Rev.*, **78** : 1193-1231 (1998)
- 50) **Bringham R.F, Demay,M.B., Kronenberg H.M.,** Hormones and disorders of mineral metabolism. In : *Williams Textbook of Endocrinology*, Saunders W.B., Elsevier, (2003)
- 51) **Hendy,G.N., Hruska,K.A., Mathew,S., Goltzman,D.** New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D, *Kidney Int.*, **69** : 218-223 (2006)
- 52) **Nguyen-Yamamoto,L., Rousseau,L., Brossard,J.H., Lepage,R., D'amour,P.** Synthetic Carboxyl-Terminal Fragments of Parathyroid Hormone (PTH) Decrease Ionized Calcium Concentration in Rats by Acting on a Receptor Different from the PTH/PTH-Related Peptide Receptor, *Endocrinology*, **142** : 1386-1392 (2001)
- 53) **Qin,L., Raggatt,L.J., Partridge,N.C.** Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism, *Trends Endocrinol Metab*, **15** : 60-65 (2004)
- 54) **Rachez,C., Freedman,L.P.** Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions, *Gene*, **246** : 9-21 (2000)
- 55) **Kato,S.** The function of vitamin D receptor in vitamin D action, *J Biochem.(Tokyo)*, **127** : 717-722 (2000)
- 56) **Christakos,S., Dhawan,P., Shen,Q., Peng,X., Benn,B., Zhong,Y.** New insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25dihydroxyvitamin D3, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1068** : 194-203 (2006)
- 57) **Dowd,D.R., Sutton,A.L.M., Zhang,C., MacDonald,P.N.,** Comodulateur of vitamin D receptor-mediated gene expression. In : *Vitamin D*, Feldman, D, Pike, J. W., and Glorieux, F. H., Elsevier, 291-304 (2005)

- 58) **Norman,A.W.** Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor, *Endocrinology*, **147** : 5542-5548 (2006)
- 59) **Nemere,I., Dormanen,M.C., Hammond,M.W., Okamura,W.H., Norman,A.W.** Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25- dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcalcachia, *Journal of Biological Chemistry*, **269** : 23750-23756 (1994)
- 60) **Erben,R.G., Soegiarto,D.W., Weber,K., Zeitz,U., Lieberherr,M., Gniadecki,R., Moller,G., Adamski,J., Balling,R.** Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D, *Mol Endocrinol*, **16** : 1524-1537 (2002)
- 61) **Palacios,C.** The role of nutrients in bone health, from A to Z, *Crit Rev Food Sci.Nutr*, **46** : 621-628 (2006)
- 62) **Broadus A E,** Mineral balance and homeostasis. In : *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Favus M J, American society for bone and mineral research, Washington; 105-111 (2003)
- 63) **Faivre-Defrance,F., Marcelli-Tourvieille,S., Odou,M.F., Porchet,N., Wemeau,J.L., Vantghem,M.C.** [Calcium sensing receptor: physiology and pathology], *Ann.Endocrinol (Paris)*, **67** : 45-53 (2006)
- 64) **Brown E M,** Calcium-sensing Receptor. In : *Primers of the metabolic bone diseases and disorders of the mineral metabolism*, Favus M J, American society for bone and mineral research, Washington; 111-117 (2003)
- 65) **Ilich,J.Z., Kerstetter,J.E.** Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium, *Journal of the American College of Nutrition*, **19** : 715-737 (2000)
- 66) **Institute of Medicine, Food and nutrition board.** Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and Fluoride. 1997.
- 67) **Heaney,R.P.** Phosphorus nutrition and the treatment of osteoporosis, *Mayo Clin.Proc.*, **79** : 91-97 (2004)
- 68) **Shah,B.G., Krishnarao,G.V., Draper,H.H.** The relationship of Ca and P nutrition during adult life and osteoporosis in aged mice, *J Nutr*, **92** : 30-42 (1967)
- 69) **Marks,S.C., Jr., Odgren,P.R.,** Structure and development of the skeleton. In : *Principles of bone biology*, Bilezikian J, Raisz L, and Rodan G, Academic Press, 3-15 (2002)

- 70) **Scott F.G.**, Paraxial and intermediate mesoderm. In : *Developmental Biology 6th ed.*, Sinauer Associates, Inc, Sunderland (MA); (2000)
- 71) **Zoetis,T., Tassinari,M.S., Bagi,C., Walthall,K., Hurtt,M.E.**
Species comparison of postnatal bone growth and development, Birth Defects Res.B Dev.Reprod.Toxicol., **68** : 86-110 (2003)
- 72) **Leeson T.S., Leeson C.R.**, Tissus Conjonctif spécialisé : Cartilage et os. In : *Histologie*, Masson et Cie, Paris; 97-116 (1971)
- 73) **Young,M.F.** Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis, Osteoporos.Int., **14 Suppl 3** : S35-S42 (2003)
- 74) **Chu S**, Basic Sciences. In : *Electronic Orthopedic Textbook*, Eugene Sherry, MD MPH FRACS, (1997)
- 75) **Boskey,A.L.** Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities, J.Cell Biochem.Suppl, **30-31** : 83-91 (1998)
- 76) **Glimcher M J**, The nature of the mineral phase in bone; Biological and clinical implications. In : *Metabolic Bone Disease*, Academic Press, 23-50 (1998)
- 77) **Javaid,M.K., Cooper,C.** Prenatal and childhood influences on osteoporosis, Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab, **16** : 349-367 (2002)
- 78) **Eames,B.F., de la,F.L., Helms,J.A.** Molecular ontogeny of the skeleton, Birth Defects Res.C.Embryo.Today, **69** : 93-101 (2003)
- 79) **Vaananen,K.** Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics, Adv.Drug Deliv.Rev, **57** : 959-971 (2005)
- 80) **Mosekilde,L., Melsen,F.** A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism, Acta Med Scand., **204** : 97-102 (1978)
- 81) **Davison,K.S., Siminoski,K., Adachi,J.D., Hanley,D.A., Goltzman,D., Hodsman,A.B., Josse,R., Kaiser,S., Olszynski,W.P., Papaioannou,A., Ste-Marie,L.G., Kendler,D.L., Tenenhouse,A., Brown,J.P.** Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts, Semin.Arthritis Rheum., **36** : 22-31 (2006)
- 82) **Parfitt A.M.**, Vitamin D and the pathogenesis of rickets and osteomalacia. In : *Vitamin D*, Feldman, D, Pike, J. W., and Glorieux, F. H., Elsevier, 1029-1048 (2005)
- 83) **Skorecki K, Green J, Brenner B.M.** Chronic renal failure. In : *Harrison's Internal Medicine*, Kasper D.L, Braunwald E, Fauci A.S,

Hauser S.L, Longo D.L, Jameson L, and Isselbacher K.J, McGraw-Hill Companies, New York (NY); (2006)

- 84) **Li,Y.C., Amling,M., Pirro,A.E., Priemel,M., Meuse,J., Baron,R., Delling,G., Demay,M.B.** Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice, *Endocrinology*, **139** : 4391-4396 (1998)
- 85) **Donohue,M.M., Demay,M.B.** Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes, *Endocrinology*, **143** : 3691-3694 (2002)
- 86) **Sabbagh,Y., Carpenter,T.O., Demay,M.B.** Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102** : 9637-9642 (2005)
- 87) **Amling,M., Priemel,M., Holzmann,T., Chapin,K., Rueger,J.M., Baron,R., Demay,M.B.** Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses, *Endocrinology*, **140** : 4982-4987 (1999)
- 88) **Olsen,B.R., Reginato,A.M., Wang,W.** Bone development, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **16** : 191-220 (2000)
- 89) **Takigawa,M., Nakanishi,T., Kubota,S., Nishida,T.** Role of CTGF/HCS24/ecogenin in skeletal growth control, *J.Cell Physiol*, **194** : 256-266 (2003)
- 90) **Hochberg,Z.** Clinical physiology and pathology of the growth plate, *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab*, **16** : 399-419 (2002)
- 91) **Marshall,O.J., Harley,V.R.** Molecular mechanisms of SOX9 action, *Mol Genet.Metab*, **71** : 455-462 (2000)
- 92) **Kobayashi,T., Kronenberg,H.** Minireview: transcriptional regulation in development of bone, *Endocrinology*, **146** : 1012-1017 (2005)
- 93) **Harley,V.R., Clarkson,M.J., Argentaro,A.** The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9], *Endocr.Rev*, **24** : 466-487 (2003)
- 94) **Bernard,P., Tang,P., Liu,S., Dewing,P., Harley,V.R., Vilain,E.** Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination, *Human Molecular Genetics*, **12** : 1755-1765 (2003)
- 95) **John Hopkins University.** SOX9. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), National Institute of Health . 10-30-2006.

- 96) **Genzer,M.A., Bridgewater,L.C.** A Col9a1 enhancer element activated by two interdependent SOX9 dimers, *Nucleic Acids Res.*, 2007)
- 97) **Kou,I., Ikegawa,S.** SOX9-dependent and -independent transcriptional regulation of human cartilage link protein, *J Biol Chem.*, **279** : 50942-50948 (2004)
- 98) **Ikeda,T., Kawaguchi,H., Kamekura,S., Ogata,N., Mori,Y., Nakamura,K., Ikegawa,S., Chung,U.I.** Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation, *J Bone Miner.Metab*, **23** : 337-340 (2005)
- 99) **de Crombrughe,B., Lefebvre,V., Behringer,R.R., Bi,W., Murakami,S., Huang,W.** Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation, *Matrix Biol*, **19** : 389-394 (2000)
- 100) **Akiyama,H., Chaboissier,M.C., Martin,J.F., Schedl,A., de Crombrughe,B.** The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6, *Genes and Development*, **16** : 2813-2828 (2002)
- 101) **Kawakami,Y., Rodriguez-Leon,J., Belmonte,J.C.** The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis, *Curr.Opin.Cell Biol*, **18** : 723-729 (2006)
- 102) **Leask,A., Abraham,D.J.** The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology, *Biochem.Cell Biol.*, **81** : 355-363 (2003)
- 103) **Perbal,B.** NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues, *Mol Pathol.*, **54** : 57-79 (2001)
- 104) **Nishida,T., Kubota,S., Nakanishi,T., Kuboki,T., Yosimichi,G., Kondo,S., Takigawa,M.** CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes, *J Cell Physiol*, **192** : 55-63 (2002)
- 105) **Ivkovic,S., Yoon,B.S., Popoff,S.N., Safadi,F.F., Libuda,D.E., Stephenson,R.C., Daluiski,A., Lyons,K.M.** Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development, *Development*, **130** : 2779-2791 (2003)
- 106) **Eguchi,T., Kubota,S., Kondo,S., Shimo,T., Hattori,T., Nakanishi,T., Kuboki,T., Yatani,H., Takigawa,M.** Regulatory mechanism of human connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24) gene expression in a human chondrocytic cell line, HCS-2/8, *J Biochem.(Tokyo)*, **130** : 79-87 (2001)

- 107) **Pucci,B., Adams,C.S., Fertala,J., Snyder,B.C., Mansfield,K.D., Tafani,M., Freeman,T., Shapiro,I.M.** Development of the terminally differentiated state sensitizes epiphyseal chondrocytes to apoptosis through caspase-3 activation, *J Cell Physiol*, **210** : 609-615 (2007)
- 108) **Shapiro,I.M., Adams,C.S., Freeman,T., Srinivas,V.** Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate, *Birth Defects Res.C Embryo.Today*, **75** : 330-339 (2005)
- 109) **Vu,T.H., Shipley,J.M., Bergers,G., Berger,J.E., Helms,J.A., Hanahan,D., Shapiro,S.D., Senior,R.M., Werb,Z.** MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes, *Cell*, **93** : 411-422 (1998)
- 110) **Zelzer,E., Mamluk,R., Ferrara,N., Johnson,R.S., Schipani,E., Olsen,B.R.** VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development, *Development*, **131** : 2161-2171 (2004)
- 111) **Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., Dvorak,H.F.** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, **219** : 983-985 (1983)
- 112) **Ferrara,N.** Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress, *Endocrine Reviews*, **25** : 581-611 (2004)
- 113) **Ferrara,N.** Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis, *Am.J Physiol Cell Physiol*, **280** : C1358-C1366 (2001)
- 114) **Harada S, Thomas,K.A.,** Vascular endothelial growth factors. In : *Principles of bones biology*, Bilezikian J, Raisz L, and Rodan G, Acaemic Press, 883-902 (2002)
- 115) **Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., Ferrara,N.** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation, *Nat.Med*, **5** : 623-628 (1999)
- 116) **Maes,C., Stockmans,I., Moermans,K., Van,L.R., Smets,N., Carmeliet,P., Bouillon,R., Carmeliet,G.** Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival, *J Clin.Invest*, **113** : 188-199 (2004)
- 117) **Zelzer,E., McLean,W., Ng,Y.S., Fukai,N., Reginato,A.M., Lovejoy,S., D'Amore,P.A., Olsen,B.R.** Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis, *Development*, **129** : 1893-1904 (2002)

- 118) **Bergers,G., Brekken,R., McMahon,G., Vu,T.H., Itoh,T., Tamaki,K., Tanzawa,K., Thorpe,P., Itohara,S., Werb,Z., Hanahan,D.** Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, *Nat Cell Biol*, **2** : 737-744 (2000)
- 119) **Deckers,M.M.L., Karperien,M., van der Bent,C., Yamashita,T., Papapoulos,S.E., Lowik,C.W.G.M.** Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors during Osteoblast Differentiation, *Endocrinology*, **141** : 1667-1674 (2000)
- 120) **Aldridge,S.E., Lennard,T.W.J., Williams,J.R., Birch,M.A.** Vascular endothelial growth factor receptors in osteoclast differentiation and function, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **335** : 793-798 (2005)
- 121) **Shibuya,M., Claesson-Welsh,L.** Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Exp.Cell Res.*, **312** : 549-560 (2006)
- 122) **Ortega,N., Behonick,D.J., Werb,Z.** Matrix remodeling during endochondral ossification, *Trends Cell Biol*, **14** : 86-93 (2004)
- 123) **Ortega,N., Behonick,D., Stickens,D., Werb,Z.** How proteases regulate bone morphogenesis, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **995** : 109-116 (2003)
- 124) **Van den Steen,P.E., Dubois,B., Nelissen,I., Rudd,P.M., Dwek,R.A., Opdenakker,G.** Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), *Crit Rev Biochem.Mol Biol*, **37** : 375-536 (2002)
- 125) **Engsig,M.T., Chen,Q.J., Vu,T.H., Pedersen,A.C., Therkidsen,B., Lund,L.R., Henriksen,K., Lenhard,T., Foged,N.T., Werb,Z., Delaisse,J.M.** Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones, *J Cell Biol*, **151** : 879-889 (2000)
- 126) **Lee,E.R., Murphy,G., El-Alfy,M., Davoli,M.A., Lamplugh,L., Docherty,A.J., Leblond,C.P.** Active gelatinase B is identified by histozyomography in the cartilage resorption sites of developing long bones, *Dev.Dyn.*, **215** : 190-205 (1999)
- 127) **Vu,T.H., Werb,Z.** Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology, *Genes and Development*, **14** : 2123-2133 (2000)
- 128) **Frost,H.M., Jee,W.S.** On the rat model of human osteopenias and osteoporoses, *Bone Miner.*, **18** : 227-236 (1992)
- 129) **Iwamoto,J., Takeda,T., Sato,Y.** Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats, *Exp.Anim*, **54** : 1-6 (2005)

- 130) **Turner,R.T., Maran,A., Lotinun,S., Hefferan,T., Evans,G.L., Zhang,M., Sibonga,J.D.** Animal models for osteoporosis, *Rev.Endocr.Metab Disord.*, **2** : 117-127 (2001)
- 131) **Haddad,P., Gascon-Barre,M., Brault,G., Plourde,V.** Influence of calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D3 supplementation on the hepatic microsomal and in vivo metabolism of vitamin D3 in vitamin D-depleted rats, *J.Clin.Invest*, **78** : 1529-1537 (1986)
- 132) **Mailhot,G., Petit,J.L., Dion,N., Deschenes,C., Ste-Marie,L.G., Gascon-Barre,M.** Endocrine and bone consequences of cyclic nutritional changes in the calcium, phosphate and vitamin D status in the rat: An in vivo depletion-repletion-redepletion study, *Bone*, 2007)
- 133) **Cathala,G., Savouret,J.F., Mendez,B., West,B.L., Karin,M., Martial,J.A., Baxter,J.D.** A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid
16, *DNA*, **2** : 329-335 (1983)
- 134) **Lemay,J., Demers,C., Hendy,G.N., Delvin,E.E., Gascon-Barre,M.** Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D3 and calcitriol administration in vivo, *J.Bone Miner.Res.*, **10** : 1148-1157 (1995)
- 135) **Conn,G., Bayne,M.L., Soderman,D.D., Kwok,P.W., Sullivan,K.A., Palisi,T.M., Hope,D.A., Thomas,K.A.** Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87** : 2628-2632 (1990)
- 136) **Okada,A., Santavicca,M., Basset,P.** The cDNA cloning and expression of the gene encoding rat gelatinase B, *Gene*, **164** : 317-321 (1995)
- 137) **Wen,Y., Edelman,J.L., Kang,T., Zeng,N., Sachs,G.** Two functional forms of vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 mRNA are expressed in normal rat retina, *J.Biol.Chem.*, **273** : 2090-2097 (1998)
- 138) **Tso,J.Y., Sun,X.H., Kao,T.H., Reece,K.S., Wu,R.** Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene, *Nucleic Acids Res.*, **13** : 2485-2502 (1985)
- 139) **Xu,J., Smock,S.L., Safadi,F.F., Rosenzweig,A.B., Odgren,P.R., Marks,S.C., Jr., Owen,T.A., Popoff,S.N.** Cloning the full-length cDNA for rat connective tissue growth factor: implications for skeletal development, *J.Cell Biochem.*, **77** : 103-115 (2000)
- 140) **Yamane,A., Seetharam,L., Yamaguchi,S., Gotoh,N., Takahashi,T., Neufeld,G., Shibuya,M.** A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver

through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1), *Oncogene*, **9** : 2683-2690 (1994)

- 141) **PubMed nucleotide.** *Rattus norvegicus* SRY-box containing gene 9 (Sox9), mRNA. XM_001081628.1 GI:109492165. 2007.
- 142) **St-Arnaud,R., Arabian,A., Travers,R., Barletta,F., Raval-Pandya,M., Chapin,K., Depovere,J., Mathieu,C., Christakos,S., Demay,M.B., Glorieux,F.H.** Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D, *Endocrinology*, **141** : 2658-2666 (2000)
- 143) **Goltzman,D., Miao,D., Panda,D.K., Hendy,G.N.** Effects of calcium and of the Vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models, *J Steroid Biochem.Mol Biol*, **89-90** : 485-489 (2004)
- 144) **Nakanishi,T., Nishida,T., Shimo,T., Kobayashi,K., Kubo,T., Tamatani,T., Tezuka,K., Takigawa,M.** Effects of CTGF/Hcs24, a Product of a Hypertrophic Chondrocyte-Specific Gene, on the Proliferation and Differentiation of Chondrocytes in Culture, *Endocrinology*, **141** : 264-273 (2000)